



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado  
Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y  
Geográfica  
Unidad de Posgrado

**Actividad antioxidante y antifúngica de compuestos  
fenólicos de la semilla de uva quebranta, recuperados  
del residuo sólido del procesamiento de pisco**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Doctora en Ciencias  
Ambientales

**AUTOR**

Maritza Elizabeth BARRIGA SÁNCHEZ

**ASESOR**

Oscar TINOCO GÓMEZ

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Barriga, M. (2018). *Actividad antioxidante y antifúngica de compuestos fenólicos de la semilla de uva quebranta, recuperados del residuo sólido del procesamiento de pisco*. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---



# UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, Decana de América

FACULTAD DE INGENIERÍA GEOLÓGICA, MINERA, METALÚRGICA Y GEOGRÁFICA

UNIDAD DE POSGRADO



## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

### SUSTENTACIÓN PÚBLICA

En la Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Lima, a los veintiséis días del mes de setiembre del 2018, siendo las 15:00 horas, se reúnen los suscritos miembros del JURADO EXAMINADOR DE TESIS, nombrado mediante Dictamen N.º 549/UPG-FIGMMG/2018 del 12 de setiembre del 2018, con la finalidad de evaluar la sustentación oral de la siguiente tesis:

#### TITULO

**«ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIFÚNGICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA SEMILLA DE UVA QUEBRANTA, RECUPERADOS DEL RESIDUO SÓLIDO DEL PROCESAMIENTO DE PISCO»**

Que, presenta la Mag. **MARITZA ELIZABETH BARRIGA SÁNCHEZ**, para optar el **GRADO ACADÉMICO DE DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES**.

El secretario del Jurado Examinador de la Tesis, analiza el expediente N.º 05596-FIGMMG-2015 del 07 de agosto del 2015, en el marco legal y Estatutario de la Ley Universitaria, acreditando que tiene todos los documentos y cumplió con las etapas del trámite según el «Reglamento de los Estudios de Doctorado».

Luego de la Sustentación de la Tesis, los miembros del Jurado Examinador procedieron a aplicar la escala descrita en el Art. 61 del precitado Reglamento, correspondiéndole a la graduando la siguiente calificación:

*Muy Bueno (17)*

Habiendo sido aprobada la sustentación de la Tesis, el Presidente recomienda a la Facultad se le otorgue el **GRADO ACADÉMICO DE DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES** a la Mag. **MARITZA ELIZABETH BARRIGA SÁNCHEZ**.

Siendo las 16:00 horas, se dio por concluido al acto académico

DR. CARLOS FRANCISCO CABRERA CARRANZA

Presidente

DR. ALFONSO RAMÓN CHUNG PINZAS

Secretario

DR. JUAN MANUEL CEVALLOS AMPUERO

Miembro

DR. WALTER ESTEBAN BARRUTIA FEIJOO

Miembro

DR. OSCAR RAFAEL TINOCO GÓMEZ

Asesor

## *DEDICATORIA*

*Con mucho cariño dedico este trabajo a mis padres Eduvina y Gonzalo, a mis adorados hijos Carlos, Marirosa y David, ellos son la inspiración de mi vida.*

*En memoria de José mi amor inolvidable, quien me motivó siempre a seguir adelante y ahora está en el cielo.*

*A mis hermanos: Mery, Hugo, Teresa y Rafael.*

*A mi grupo del doctorado de Ciencias Ambientales 2015-1 en especial a mi buena amiga Lily.*

## AGRADECIMIENTO

*Mi agradecimiento al Ing Alberto Salas, Director de Investigación, por autorizar el desarrollo de la tesis en el Instituto Tecnológico de la Producción (ITP).*

*A InnovatePeru por el financiamiento del equipo multisolvente con el proyecto PNICP-315-014.*

*A Jorge Flores y Gloria Sánchez por el apoyo en las pruebas del laboratorio.*

*Agradezco al Dr Tinoco por su asesoramiento, al Dr Alcántara y miembros de jurado por su valioso aporte en la mejora de mi tesis.*

*A mis hijos David y Marirosa por su apoyo en mis estudios de doctorado.*

## ÍNDICE GENERAL

### RESUMEN

### ABSTRACT

#### CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática .....	2
1.2. Formulación del problema .....	3
1.2.1. Problema general.....	3
1.2.2. Problemas específicos .....	4
1.3. Justificación teórica .....	4
1.4. Justificación práctica.....	5
1.5. Objetivos.....	5
1.5.1. Objetivo General .....	5
1.5.2. Objetivos específicos .....	6

#### CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación .....	7
2.2. Antecedentes de la investigación .....	9
2.2.1. Extracción de aceites de semilla de uva .....	9
2.2.2. Extracción de compuestos fenólicos de la semilla de uva.....	11
2.3. Bases teóricas	
2.3.1. Taxonomía de la uva .....	15
2.3.2. Aceite de semilla de uva.....	15
2.3.3. Manejo e impactos específicos en el procesamiento industrial de aceite vegetal .....	16
2.3.4. Compuestos fenólicos .....	17
2.3.5. Actividad antioxidante .....	20
2.3.6. Actividad antifúngica.....	21

2.3.7 Extracción con Fluido supercrítico (FSC) .....	23
2.3.8 Extracción con agua subcrítica .....	27
2.4 Marco conceptual .....	29
2.5 Hipótesis.....	31

### **CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA**

3.1. Materia prima.....	32
3.2. Separación de la semilla de uva.....	33
3.3. Análisis químico de la uva, orujo y semilla .....	35
3.4. Equipo de extracción multisolvente .....	35
3.5. Pruebas estadísticas. Prueba de significancia .....	37
3.6. Efecto de tamaño de partícula de la semilla de uva en la extracción de aceite con CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	38
3.7. Optimización de la extracción de aceite con CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	38
3.8. Extracción con hexano .....	41
3.9. Análisis de aceite.....	42
3.10. Extracción de compuestos fenólicos con diferentes solventes .....	42
3.10.1 Extracción de CF con agua subcrítica .....	44
3.10.2 Extracción de CF con metanol.....	44
3.10.3 Extracción de CF con etanol.....	44
3.10.4 Extracción de CF con acetona.....	45
3.10.5 Marcha fitoquímica .....	45
3.11 Determinación de compuestos fenólicos totales.....	46
3.12 Medida de la actividad antioxidante.....	47
3.12.1 Determinación de FRAP .....	47
3.12.2 Determinación de capacidad antioxidante en equivalente trolox (CAET) usando el DPPH.....	47
3.13 Medida de la actividad antifúngica .....	48
3.13.1 Preparación del inóculo .....	48



3.13.2 La preparación e inoculación de las placas .....	48
3.13.3 Adición de las muestras e incubación de las placas.....	49
3.13.4 Controles .....	49
3.13.5 Lectura e interpretación de los resultados .....	49

## **CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1 Análisis, interpretación y discusión de los resultados .....	50
4.1.1 Caracterización de uva, orujo y semilla .....	50
4.1.2 Efecto de tamaño de partícula de la semilla de uva en la extracción de aceite con CO <sub>2</sub> supercrítico .....	51
4.1.3 Curvas de extracción de aceite con CO <sub>2</sub> supercrítico .....	52
4.1.4 Análisis del diseño compuesto central DCC .....	53
4.1.5 Optimización de extracción de aceite con CO <sub>2</sub> supercrítico ....	56
4.1.6 Extracción de aceite de la semilla de uva con los parámetros optimizados.....	61
4.1.7 Rendimiento, perfil de ácidos grasos, valor peróxido (POV) y anisidina del aceite extraído con CO <sub>2</sub> (parámetros optimizados) y del aceite extraído con hexano .....	62
4.1.8 Compuesto fenólico del extracto de semilla desgrasada.....	63
4.1.9 Actividad antioxidante del extracto de semilla desgrasada.....	67
4.1.9.1 Reducción del complejo férrico a ferroso (FRAP) .....	67
4.1.9.2 Reducción del radical libre DPPH (1,1 difenil-2-picrilhidrazil) .....	69
4.1.10 Marcha fitoquímica. ....	71
4.1.11 Medida de Actividad antifúngica.....	74
4.2. Contrastación de hipótesis	
4.2.1 Hipótesis específica 1 .....	80
4.2.2 Hipótesis específica 2.....	82

4.2.3 Hipótesis específica 3.....	83
4.2.4 Hipótesis general.....	87

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>87</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>88</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>89</b>

## **ANEXOS**

<b>Anexo 1.</b> Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y prueba T de los rendimientos de aceite en función al tamaño de partícula de la semilla de uva ( $P=0.01$ ).....	97
<b>Anexo 2.</b> Prueba de distribución normal y de homogeneidad de varianza de los datos de rendimiento, POV y Anisidina del aceite de semilla de uva.....	98
<b>Anexo 3.</b> Análisis de varianza del diseño Superficie Respuesta del valor peróxido VS Presión, temperatura y Flujo .....	100
<b>Anexo 4.</b> Análisis de varianza del diseño Superficie Respuesta de anisidina VS Presión, temperatura y Flujo .....	101
<b>Anexo 5.</b> Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza de los rendimientos de aceite de semilla de uva extraídos con CO <sub>2</sub> supercrítico y hexano.....	102
<b>Anexo 6.</b> Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y grafico de residuos de CF, FRAP y DPPH de los extractos etanólico, metanólico, acetona y agua subcrítica ( $P=0.01$ ).....	103
<b>Anexo 7.</b> ANOVA y prueba de comparaciones (Tuckey) de los valores de CF (EAG/100 g de semilla) a 1, 2 y 3 horas de extracción.....	106
<b>Anexo 8.</b> ANOVA y prueba de comparaciones (Tuckey) de los valores de FRAP (umol trolox/ g de semilla) a 1, 2 y 3 horas de extracción.....	108
<b>Anexo 9.</b> ANOVA y prueba de comparaciones (Tuckey) de los valores de CAET (mg ET/mg extracto seco) a 1, 2 y 3 horas de extracción .....	110

<b>Anexo 10.</b> Gráficos de interacción de los promedios de los CF, FRAP y CAET en función del solvente y el tiempo. Generados con el Minitab a partir del diseño factorial.....	112
<b>Anexo 11.</b> Gráficos de efecto principal de los promedios de los CF, FRAP y CAET en función del solvente y el tiempo. Generados con el Minitab a partir del diseño factorial.....	113
<b>Anexo 12.</b> Prueba de normalidad de los diámetros de los halos formados por acción del extracto de la semilla de uva.....	114
<b>Anexo 13.</b> Cepas de <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>Candida albicans</i> <b>A.</b> -Adquiridas del Instituto Nacional de Salud. <b>B.</b> - Resiembra <i>T. rubrum</i> . <b>C.</b> -Resiembra <i>T. mentagrophytes</i> . <b>D.</b> - Cultivo en Agar .....	116

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	viii
--------------------------------	------

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	x
--------------------------------	---

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Características Físicas y Químicas del aceite de semilla de uva .....	16
<b>Cuadro 2.</b> Ácidos grasos en aceite de semilla de uva .....	16
<b>Cuadro 3.</b> Parámetros físicos de algunos solventes.....	24
<b>Cuadro 4.</b> Densidad (g/ml) del CO <sub>2</sub> supercrítico en función de la temperatura (°C) y presión (Mpa).....	26
<b>Cuadro 5.</b> Valores mínimo y máximo de las variables independientes ingresados al Minitab y rangos de niveles establecidos por el Minitab .....	39
<b>Cuadro 6.</b> Diseño central compuesto (DCC) para la optimización del rendimiento de aceite de las semillas de uva. ....	40
<b>Cuadro 7.</b> Diseño factorial para la extracción de compuestos fenólicos A: solventes; B: Tiempo de extracción.....	43
<b>Cuadro 8.</b> Caracterización del orujo fresco, seco y de la semilla (g/100 g de muestra) ..	50
<b>Cuadro 9.</b> Rendimientos, valores de POV y anisidina del aceite de los experimentos del DCC .....	54
<b>Cuadro 10.</b> ANOVA del diseño de Superficie Respuesta del rendimiento (R) (g aceite/100 g de semilla) versus presión, temperatura y flujo (P=0.01) .....	55
<b>Cuadro 11.</b> Secuencia del Minitab para el Análisis del diseño superficie respuesta .....	57
<b>Cuadro 12.</b> Optimización con el método superficie respuesta (Minitab) .....	57
<b>Cuadro 13.</b> Resultados de optimización del programa Minitab.....	58
<b>Cuadro 14.</b> Perfil de los ácidos grasos del aceite de la semilla de uva quebranta extraído con CO <sub>2</sub> supercrítico y con hexano. ....	62
<b>Cuadro 15.</b> Valores de POV y Anisidina del aceite extraído con CO <sub>2</sub> supercrítico (optimizado) y con hexano .....	63

<b>Cuadro 16.</b> Diseño factorial y las variables respuesta: valores de Compuestos fenólicos expresado en equivalente de ácido gálico/ 100 g de semilla seca y capacidad antioxidante: FRAP y CAET.....	65
<b>Cuadro 17.</b> Análisis del diseño factorial de los CF de los extractos en función de los Solventes y tiempo de extracción.....	66
<b>Cuadro 18.</b> Promedios y desviación estándar de los CF en equivalente de ácido gálico/ 100 g de semilla seca .....	66
<b>Cuadro 19.</b> Análisis del diseño factorial de los valores de FRAP de los extractos en función de los Solventes y tiempo de extracción .....	68
<b>Cuadro 20.</b> Promedios de los valores FRAP (Poder de reducción antioxidante del hierro en $\mu\text{mol trolox/g}$ de semilla) con la desviación estándar.....	69
<b>Cuadro 21.</b> Análisis del diseño factorial de los valores de CAET ( $\text{mg ET/mg extracto}$ de los extractos) en función de los Solventes y tiempo de extracción ( $R^2=93.7\%$ ).....	70
<b>Cuadro 22.</b> Promedios de los valores CAET, ( $\text{mg ET/mg extracto}$ ) con la desviación estándar en función al tiempo de extracción .....	71
<b>Cuadro 23.</b> Marcha fitoquímica de los extractos obtenidos con acetona, metanol, agua subcrítica y etanol.....	72
<b>Cuadro 24.</b> Diámetro de los halos de inhibición (mm) por la acción de los extractos etanólico (EtOH) y metanólico (MetOH) contra <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> y <i>Cándida albicans</i> .....	79
<b>Cuadro 25.</b> Estadísticos y la prueba T para muestras independientes de los rendimientos de aceite de la semilla de uva obtenidos con hexano y con $\text{CO}_2$ supercrítico .....	81
<b>Cuadro 26.</b> Prueba T de student, comparación de la medida de los diámetros de los halos de inhibición de los extractos (35 mg/mL) con un valor especificado ( $> 18 \text{ mm}$ )....	84
<b>Cuadro 27.</b> Prueba T de student, comparación de la medida de los diámetros de los halos de inhibición de los extractos (25 mg/mL) con un valor especificado ( $> 18 \text{ mm}$ )....	85
<b>Cuadro 28.</b> Prueba T de student, comparación de la medida de los diámetros de halos de inhibición de los extractos (15 mg/mL) con un valor especificado ( $> 18 \text{ mm}$ ) .....	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de compuestos fenólicos simples.....	18
<b>Figura 2.</b> Estructuras representativas de flavonoides .....	19
<b>Figura 3.</b> Estructura química de un tanino.....	19
<b>Figura 4.</b> Diagrama de presión -Temperatura, región supercrítica. ....	25
<b>Figura 5.</b> Tres periodos diferentes en la curva de extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico.....	27
<b>Figura 6.</b> Constante dieléctrica del agua vs la temperatura; y de mezclas de agua con metanol y agua con acetonitrilo .....	28
<b>Figura 7.</b> Diseño experimental para obtener aceite y extracto de compuestos fenólicos .....	34
<b>Figura 8.</b> Equipo extractor multisolvente Top-Industrie.....	36
<b>Figura 9.</b> Esquema de la secuencia de la extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico usando el equipo multisolvente Top-Industrie .....	36
<b>Figura 10.</b> Esquema de la extracción con agua subcrítica usando el equipo multisolvente Top-Industrie .....	37
<b>Figura 11.</b> Contenidos de aceite de las semillas de uva con diferentes tamaños de partícula.....	51
<b>Figura 12.</b> Cinética de extracción de aceite con CO <sub>2</sub> supercrítico .....	53
<b>Figura 13.</b> Diagrama Superficie respuesta a) Efecto de la T y F a 210 bar. b) Efecto de P y F a 50 °C . c) Efecto de a P y T a 40 g CO <sub>2</sub> /min .....	60
<b>Figura 14.</b> Diagrama de contorno de rendimiento de aceite a) Efecto del Flujo y Temperatura a 210 bar. b) Efecto de la temperatura y presión a 40 g CO <sub>2</sub> /min c) Efecto del flujo y presión a 50 °C .....	60
<b>Figura 15.</b> Extracción de aceite de semilla de uva .....	61

<b>Figura 16.</b> Contenido de CF en EAG/100g de semilla desgrasada de uva con diferente solvente a 1, 2 y 3 h de extracción .....	67
<b>Figura 17.</b> Capacidad antioxidante (FRAP en umol trolox/g semilla) de los extractos de semilla desgrasada de uva con diferente solvente a 1, 2 y 3 h de extracción.....	69
<b>Figura 18.</b> CAET (mg TE/mg extracto seco) de los extractos de semilla desgrasada de uva con diferente solvente a 1, 2 y 3 h de extracción .....	71
<b>Figura 19.</b> Actividad antifúngica método de difusión en agar de extracto A) metanólico y B) Etanólico, de semillas de uva a las concentraciones de extracto 1:15 mg/mL, 2:25 mg/mL y 3:35 mg/mL, contra <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (Cepas procedente del INS).....	76
<b>Figura 20.</b> Actividad antifúngica método de difusión en agar del extracto A) metanólico y B) Etanólico, de semillas de uva a las concentraciones de extracto 1:15 mg/mL, 2:25 mg/mL y 3:35 mg/mL contra <i>Trichophyton rubrum</i> (Cepas procedente del INS).....	77
<b>Figura 21.</b> Control negativo: <i>T. mentagrophytes</i> en el medio de cultivo .....	77
<b>Figura 22.</b> Control positivo: <i>Candida Albicans</i> , en el pozo fluconazol, con halo de inhibición de 52mm.....	78
<b>Figura 23.</b> Ausencia de Actividad antifúngica método de difusión en agar de los extractos metanólico y etanólico de semillas de uva A:metanólico y B: etanólico de semillas a 1) 15 mg/mL, 2) 25 mg/mL y 3) 35 mg/mL, contra <i>Candida albicans</i> (Cepas procedente del INS).....	78
<b>Figura 24.</b> Rendimientos de aceite de la extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico (optimizado) y con hexano .....	81
<b>Figura 25.-</b> Media de los diámetros de halo de inhibición de extracto etanólico (EtOH) metanólico (MeOH) a 3 concentraciones (15, 25 y 35 mg/ml) contra el <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> y <i>Candida albicans</i> .....	86

## RESUMEN

La industria de pisco genera elevada cantidad de residuo orgánico de uva conocido como orujo, el cual muchas veces es desaprovechado por la industria. En este sentido, con la finalidad de proporcionar una alternativa de uso del residuo de la industria del pisco, el objetivo del presente trabajo fue realizar la medición de la actividad antioxidante y antifúngica de las semillas del orujo. Previamente se realizó la optimización (con el método superficie respuesta) de la extracción de aceite con CO<sub>2</sub> supercrítico, en la cual una de las variables respuesta fue el rendimiento, luego se realizó un diseño factorial para las extracciones de compuestos fenólicos (CF) de la semilla de uva desgrasada, los factores independientes fueron los solventes: etanol, metanol, acetona y agua subcrítica, y el tiempo (1, 2 y 3 horas), las variables respuesta fueron los CF, actividad antioxidante (CAETy FRAP), finalmente se realizó la medición de la actividad antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Candida Albicans*. Los parámetros de optimización para lograr el mayor rendimiento de aceite fueron 188 bar, 33 °C y 40 g de CO<sub>2</sub>/min. A las tres horas de extracción con acetona, etanol y metanol, se lograron obtener extractos con las mayores capacidades antioxidantes (mayor reducción del radical libre DPPH) con los valores: 1.53, 1.17 y 1.11 mg ET/mg extracto seco; las cuales superan la capacidad antioxidante del trolox (antioxidante sintético); en el caso del extracto obtenido con agua subcrítica la capacidad antioxidante fue de 0.94 mg ET/mg extracto seco. Los extractos etanólico y metanólico de la semilla de uva, a las concentraciones de 25 y 35 mg/mL, formaron un halo de diámetro mayor a 18 mm, demostrando actividad antifúngica contra el *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Este trabajo propone una alternativa de uso de la semilla de uva con la finalidad de disminuir el volumen de residuo orgánico de la industria del pisco.

**Palabra clave:** residuo de Pisco, semilla de uva, CO<sub>2</sub> supercrítico, antioxidante, actividad antifúngica.



## ABSTRACT

The pisco industry generates a high amount of organic grape residue known as pomace, which is often wasted by the industry. In that sense, in order to provide an alternative use of the waste of the pisco industry, the objective of the present work was to measure the antioxidant and antifungal activity of the pomace seeds. Previously, the optimization (with the surface response method) of the extraction of oil with supercritical CO<sub>2</sub> was carried out, in which one of the response variables was the yield, then a factorial design was made for the extractions of phenolic compounds (CF) from the defatted grape seed, the independent factors were the solvents: ethanol, methanol, acetone and subcritical water, and time (1, 2 and 3 hours), the response variables were the CF, antioxidant activity (CATE and FRAP), finally the measurement was made of the antifungal activity against *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* and *Candida Albicans*. The optimization parameters to achieve the highest oil yield were 188 bar, 33 ° C and 40 g CO<sub>2</sub> / min. After three hours of extraction with acetone, ethanol and methanol, extracts with the highest antioxidant capacities were obtained (greater reduction of free radical DPPH) with the following values: 1.53; 1.17 and 1.11 mg TE / mg dry extract, which surpass the antioxidant capacity of trolox (synthetic antioxidant); in the case of the extract obtained with subcritical water, the antioxidant capacity was 0.94 mg TE/mg dry extract. The ethanolic and methanolic extracts of the grape seed, at concentrations of 25 and 35 mg / mL, formed a halo with a diameter greater than 18 mm, demonstrating antifungal activity against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*.

This work propose an alternative use of the grape seed in order to reduce the volume of organic waste from the pisco industry.

**Keyword:** Pisco residue, grape seed, supercritical CO<sub>2</sub>, antioxidant, antifungal activity.

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

En la presente tesis se evaluó el contenido de aceite y compuestos fenólicos de la semilla de uva Quebranta que forma parte del orujo, residuo sólido de la elaboración de pisco, para contribuir con una alternativa de uso integral del recurso uva y que la industria productora de pisco considere la posibilidad de dar valor agregado a las semillas para la disminución de la generación de residuos.

El capítulo 1 menciona la situación problemática relacionada a los residuos producidos por la industria alimentaria, se formula el problema y los objetivos, así como la justificación teórica y práctica.

El capítulo 2, comprende el marco teórico, el marco filosófico, los antecedentes de la investigación relacionados a técnicas de extracción de compuestos bioactivos de la semilla de uva y las bases teóricas las cuales explican los fundamentos de la técnica de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, las actividades antioxidantes y antifúngica, entre otros temas.

El capítulo 3, muestra la metodología del experimento que consta de tres etapas (Figura 7): la primera es la optimización de la extracción de aceite; la segunda etapa la extracción con etanol, metanol, acetona y agua subcrítica de la semilla desgrasada de uva quebranta y medición de la actividad antioxidante de los extractos. La tercera etapa corresponde a la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos contra el *Trichophyton rubrum*, *Cándida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*.

En el capítulo 4 se detalla el análisis, interpretación y discusión de los resultados.

### **1.1. Situación problemática**

La industria alimentaria genera grandes cantidades de residuos orgánicos, la industria cárnica en el rango de 30-52 %; la industria pesquera de 30 a 75 %, de vegetales de 5 a 50%, la industria oleaginosa de 40 a 70% y la industria azucarera cerca de 88% (Restrepo, 2006); si bien es cierto que no tienen carácter peligroso, es recomendable manejarlos adecuadamente y disminuir los porcentajes de residuos para lograr el uso integral del recurso. En Ica, las plantas procesadoras de pisco, llamadas bodegas, elaboran 1 litro de pisco a partir de 6 a 7 kg de uva (Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo, 2004) generando elevadas cantidades de orujo (residuo sólido), a veces lo usan como compostaje, o lo queman causando mayor contaminación ambiental, frecuentemente los residuos son arrojados a los terrenos descampados cerca a las industrias, originando plagas de insectos, que podrían transmitir enfermedades. El uso sostenible de un recurso natural implica reducir los impactos ambientales negativos sin perjudicar el desarrollo económico, generando menor cantidad de residuos, para lograr el uso integral del recurso, sin utilizar métodos que puedan causar perjuicios al medio ambiente, de ese modo se podría “valorizar” los residuos. Algunos investigadores están realizando trabajos de investigación para el aprovechamiento de los residuos, ya sea para destinarlo como alimento de animales o para obtener algún componente de interés para la salud humana.

En relación a la producción nacional de uva, los últimos años llegó a 597.9; 690 y 644.7 miles de toneladas en el 2015, 2016 y 2017 respectivamente, el destino de la uva puede ser para la industria de vino, pisco o para su consumo directo (de mesa). La producción de pisco va en aumento, llegando a 3,764; 4,191 y 4,183 miles de litros durante los años 2015, 2016 y 2017 respectivamente (INEI, 2017). Considerando la producción de 4,183 miles de litros de pisco en el 2017, la cantidad de uva empleada fue de 29,281

t, estimándose 1464,1 t de semillas en el orujo, residuo del procesamiento de pisco.

Por otro lado, una alternativa de uso del orujo de uva es como fertilizante orgánico en suelos agrícolas directamente o después de un tratamiento de compostaje (Díaz, Madejón, López, López y Cabrera, 2002), algunos autores mencionan que hay efectos beneficiosos en el crecimiento de las plantas, y otros autores revelan posibles efectos negativos sobre la planta como consecuencia de sus propiedades iniciales, en particular la presencia de sustancias fitotóxicas y antibacterianas, como etanol, ácidos orgánicos (láctico y acético, entre otros) y compuestos fenólicos (CF), el cual tiene resistencia a la degradación biológica (Bustamante, Moral, Paredes, Pérez-Espinoza, Moreno-Caselles, Pérez-Murcia, 2008) e impide la asimilación de nutrientes a la planta.

En el presente trabajo se evaluó a la semilla de uva quebranta de Ica, que forma parte del orujo, residuo del proceso de elaboración de pisco, se realizaron extracciones de aceite con una técnica amigable al medio ambiente y luego extracciones de compuestos fenólicos.

Al extracto fenólico se le midió la actividad antioxidante y la actividad antifúngica ante *Trichophyton rubrum*, *Cándida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*, esto último es lo novedoso.

## **1.2. Formulación del problema**

### **1.2.1 Problema general**

¿En qué medida el extracto fenólico de la semilla de uva Quebranta de Ica, recuperada del residuo sólido del procesamiento de pisco, presenta actividad antioxidante y antifúngica contra el *Trichophyton rubrum*, *Cándida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*?

### 1.2.2 Problemas específicos

1. ¿Cuál es la técnica de extracción de aceite de la semilla de uva, que permite obtener el mayor rendimiento, la extracción con hexano o con CO<sub>2</sub> supercrítico?
2. ¿Cuál de los extractos de compuestos fenólicos de la semilla de uva, obtenidos con etanol, metanol, acetona y con agua subcrítica, presentan mayor actividad antioxidante?
3. ¿En qué medida el extracto de la semilla de uva presenta actividad antifúngica contra el *Trichophyton rubrum*, *Cándida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*?

### 1.3. Justificación teórica

Diferentes investigadores proponen usar los subproductos de la agroindustria como fuente de compuestos bioactivos y su aplicación en productos innovadores como nutracéuticos, farmacéuticos y cosméticos (Barba, Zhu, Koubaa, Anderson, Orlie, 2016).

Con este trabajo se contribuye con la generación de conocimiento científico sobre el rendimiento de extracción de aceite de la semilla de uva quebranta con CO<sub>2</sub> supercrítico y actividad antioxidante de los extractos de la semilla desgrasada, con nuevos datos teóricos sobre la actividad antimicótica de los extractos de la semilla desgrasada frente a los hongos *Trichophyton rubrum*, *Cándida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*, reportados como agentes patógenos de mayor prevalencia en un estudio realizado durante 30 años en Perú (Bejar et al., 2014), los extractos etanólico y metanólico presentaron actividad antifúngica contra *Trichophyton rubrum*, y *Trichophyton mentagrophytes* siendo una buena alternativa a los medicamentos antimicóticos que hacen daño al organismo humano.

## **1.4 Justificación práctica**

La producción de vino y pisco en Perú va en aumento, lo que mejora la economía de los productores, pero trae como consecuencia la mayor generación de residuos orgánicos, siendo importante su manejo.

Este estudio muestra el rendimiento de aceite de las semillas, su composición de ácidos grasos y calidad, además la capacidad antioxidante de los CF de la semilla de uva quebranta desgrasada. Las empresas pisqueras podrían implementar una línea de proceso para la recuperación de aceite y extraer los CF de las semillas, dando valor agregado a los residuos sólidos de la producción del pisco. Su aplicación beneficiará la ciudad de Ica, disminuirá la plaga de insectos que podrían propagar enfermedades. También se beneficia la población de Ica porque se disminuirá la contaminación orgánica y podría generarse empleo para la implementación de una nueva línea de proceso de la industria pisquera, colaborando con una alternativa de uso eficaz y sostenible del recurso uva.

La aplicación de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico y con agua subcrítica del presente trabajo, servirá de antecedente para el aprovechamiento de compuestos valiosos de otros residuos agroindustriales.

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 *Objetivo General***

Evaluar y demostrar la actividad antioxidante y antifúngica de los extractos fenólicos obtenidos con etanol, metanol, acetona y con agua subcrítica de la

semilla de uva variedad quebranta de Ica, recuperada del residuo sólido del procesamiento de pisco.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

- 1.- Determinar y comparar los rendimientos (R) de la extracción de aceite de la semilla de uva, obtenidos con hexano y con CO<sub>2</sub> supercrítico.
- 2.- Analizar y comparar la actividad antioxidante de los extractos de compuestos fenólicos de la semilla de uva obtenidos con etanol, metanol, acetona y con agua subcrítica.
- 3.- Analizar y demostrar la actividad antifúngica de los extractos de la semilla de uva, contra el *Trichophyton rubrum*, *Cándida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*.

## **CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación**

La investigación científica se orienta en cuantificar las actividades antioxidante y antifúngica de los extractos fenólicos de la semilla de uva, residuo agroindustrial, pero antes de ello se estudia la extracción de aceite de la semilla debido a que el aceite interfiere en la extracción de compuestos fenólicos. La extracción de compuestos fenólicos con agua subcrítica y las convencionales (acetona, metanol, etanol), se analizó y evaluó aplicando las corrientes filosóficas siguientes:

Una parte del marco epistemológico lo constituye el Positivismo, ya que se destaca dentro de esta corriente la hipótesis, la teoría, la observación y experimentación. De acuerdo a los expertos y seguidores del paradigma positivista, la experimentación es el verdadero método o el método por excelencia de la investigación científica, por lo tanto, se enfatiza que la investigación experimental es la verdadera investigación (Muñoz, 2007).

También se considera al falsacionismo o racionalismo crítico del filósofo Karl Raimund Popper, esta corriente designa la posibilidad que tiene una teoría de ser desmentida, falseada por un hecho determinado. Según Popper, si una teoría logra no ser falseada, puede quedar corroborada, pudiendo ser aceptada provisionalmente, ninguna teoría es absolutamente verdadera, sino a lo sumo “no refutada”.



**Filosofía ambiental,** Leff plantea y defiende la idea de que la crisis ambiental es una crisis del conocimiento, y debe quedar claro que las propuestas epistemológicas no persiguen la esencia de lo real, ni una verdad absoluta. El nuevo camino de la epistemología ambiental, según el Leff, implica cambios de demarcaciones, generación y adopción de nuevos conceptos, y la articulación de campos del saber antes separados. Tal concepción del saber ambiental aplicado a lo real, y luego, como recorte del universo de las cosas (la realidad), se inscribe por derecho en un constructivismo inscrito ya no en el contexto del descubrimiento, sino en un contexto de creación científica (Duval, 2007).

La epistemología ambiental es un trayecto para llegar a saber qué es el ambiente. El ambiente es el campo de relaciones entre la naturaleza y la cultura, de lo material y lo simbólico, de la complejidad del ser y del pensamiento. En este trayecto se va desplegando un itinerario epistemológico. La epistemología ambiental es una política del saber que tiene por "fin" dar sustentabilidad a la vida; es un saber que vincula las condiciones de vida únicas del planeta, con el deseo de vida del ser humano; los potenciales ecológicos y la productividad neguentrópica (entropía negativa, estado transitorio de no equilibrio) con la creatividad cultural. La epistemología ambiental da curso a un nuevo saber; un saber que emerge desde la marca de un límite, de una ley límite de la naturaleza, de la ineluctable (contra la cual no puede lucharse) ley de la entropía (Leff, 2006).

La epistemología ambiental reconoce los efectos de las formas de conocimiento en la construcción y destrucción de la realidad; del imaginario de la representación y la identidad entre el concepto y lo real; de la supremacía de la relación de conocimiento sobre la relación ética (Leff, 2006).

## **2.2. Antecedentes de la investigación**

La uva es una de las frutas de mayor cultivo en el mundo, con una producción superior a 77 millones de toneladas en el 2013, cerca del 80 % es usado en la industria del vino generando grandes cantidades de residuos, diversos investigadores han realizado estudios de la valorización de los residuos del procesamiento de la uva, considerándolo como un reto en el aspecto ecológico y económico (Rouquié, Dahdouh, Delalonde y Wisniewaki, 2017).

Debido a los beneficios en la salud y a su propiedad antioxidante, la recuperación de aceite y compuestos fenólicos de subproductos de la uva de la industria de vino es tema de estudio de varios investigadores, como puede verse a continuación:

### **2.2.1. Extracción de aceites de semilla de uva**

Maier, Schieber, Kammerer y Reinhold, (2009), estudiaron el residuo de la extracción mecánica de semillas de uva para la producción de aceite y concluyen que es una fuente de polifenoles con fuerte actividad antioxidante.

Aizpurua-Olaizola et al. (2015) realizaron la extracción de ácidos grasos de la semilla de uva con CO<sub>2</sub> supercrítico, a 250 bar y flujo constante 2 mL/min, T= 35 ° C.

Las semillas de uva, parte del residuo del proceso de elaboración de vino contiene entre 4 y 12.4% de aceite (Fernandes, Casal, Cruz, Pereira y

Ramalhosa, 2013). Constituido en mayor porcentaje por ácidos grasos poliinsaturados, con cerca de 67 % de ácido linoleico y 15 % de ácido oleico (Mieres, Andrade, García y Londoño, 2012). El ácido linoleico es un aceite esencial no puede ser sintetizado por los humanos y se recomienda su consumo como sustitución de los ácidos grasos saturados por ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) para la disminución del riesgo de enfermedades coronarias (FAO y FINUT, 2012).

Por otro lado, una técnica limpia de extracción de aceite es con fluidos supercríticos, la primera extracción comercial con fluido supercrítico se realizó en Alemania en 1978 fue el descafeinado de café, dos años después Carlton y United Breweries en Australia desarrollaron un proceso para la extracción de sabor de lúpulo usando CO<sub>2</sub>, otras aplicaciones fueron el descafeinado del té, extracción de aceites y grasas y extracción del alcohol en bebidas alcohólicas entre otros (Raventós, Duarte y Alarcón, 2002).

Velasco, Villada y Carrera, 2007, mencionaron el uso de dióxido de carbono supercrítico como solvente para la extracción de compuestos bioactivos presentes en vegetales, y que el método Soxhlet es una técnica anticuada y consumidora de mayor tiempo y solvente, que algunos solventes han sido cuestionado recientemente debido a su toxicidad (n-hexano), y que el uso de solventes no tóxicos como el CO<sub>2</sub> supercrítico y el agua son recomendables.

Existen trabajos de obtención de aceites con esta técnica en otros países, una de ellas concluye que la presión del CO<sub>2</sub> supercrítico es un parámetro que tiene efecto en la extracción del aceite de las semillas de uva, la solubilidad del aceite de la semilla incrementa a mayor presión; otro parámetro es el tamaño de partícula de las semillas de uva, tamaños de 0.39 mm, 0.49 y 0.51 mm, permiten obtener mayores extracciones de aceite que los tamaños de partícula de 0.91 mm. (Fiori, 2007; Duba y Fiori, 2015). Otro parámetro

importante en la extracción supercrítica es el ratio S/M (solvente/muestra), bajos ratios implica bajos costos de operación y alta capacidad de producción, generalmente los valores son menores que 30, no obstante altos valores del ratio (cerca de 100) son justificados para productos de alto valor (Martínez y Vance, 2007), pero para lograr la mejor relación entre la producción y costo, los valores de ratio S/M de 6.6 podrían mantenerse constante en extracciones de aceite a mayores escalas (Prado et al. 2012).

### **2.2.2. Extracción de compuestos fenólicos de la semilla de uva**

Existen diversas investigaciones relacionadas al estudio de compuestos fenólicos de la uva y de los residuos de su procesamiento. Bagchi et al., 2000, menciona que los compuestos fenólicos (CF) de las uvas poseen actividades antioxidantes y antimicrobianas y juegan un rol importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares incluso del cáncer, indica a las proantocianidinas de la semilla de uva como promotores de la disminución de los radicales libres en modelos in vivo e in vitro, ese efecto es superior a las vitaminas C, E y  $\beta$ -caroteno, previene la peroxidación en lípidos del cerebro, del hígado y daños en el ADN de animales.

Estudios de la semilla de uva mostraron mayor capacidad antioxidante en comparación con la piel de la uva, asimismo, los polifenoles de la uva juegan el rol importante de suprimir el estrés oxidativo (Xia et al., 2014). La concentración de compuestos fenólicos (CF) depende de la variedad, cultivo y de factores ambientales (Amarowicz y Weidner, 2009).

Además, debido a las restricciones legales levantadas hacia uso de antioxidantes sintéticos en alimentos, como por ejemplo el BHA (Butil-Hidroxi-Anisol) y el BHT (Butil-Hidroxi-Tolueno), se ha potenciado el empleo de antioxidantes naturales (libres de compuestos químicos sintéticos), como los compuestos fenólicos, flavonoides y tocoferoles (Velasco et al., 2007).

Existen varios trabajos de investigación de extracciones de CF realizados con diferentes técnicas y solventes.

Una técnica de extracción de proantocianidina (compuesto fenólico) de semilla de uva, fue realizado con CO<sub>2</sub> supercrítico y un porcentaje de etanol como co-solvente, ésta técnica tiene la ventaja de mantener la muestra libre de oxígeno (Eyiler, Burcin y Vural, 2011). Aizpurua-Olaizola et al. (2015) realizaron la extracción de los polifenoles con CO<sub>2</sub> supercrítico y con la adición 40 % de metanol como co-solvente.

Cornejo (2012) realizó la extracción por microondas de los CF del orujo (residuo de la producción de vino), el cual fue más eficiente que las extracciones por maceración con agua a temperatura de ebullición y que el método soxhlet con etanol: acetato de etilo: agua. Ferry et al., 2015, estudiaron la extracción acuosa con enzimas de muestras húmedas de orujo de *vitis vinifera*, seguida por una segunda extracción etanólica, estos extractos mostraron actividades antioxidantes y la disminución de colesterol.

Nawaz, Shi, Mittal y Kakuda, (2006), mencionan que las condiciones óptimas de extracción de CF de semilla de uva fue la proporción de 0.2 g/mL correspondiente a semilla/solución de etanol.

Garcia-Becerra et al., 2016, obtuvieron extractos de metanol de semilla de uva mexicana con método de maceración y soxhlet, el extracto obtenido por maceración presentó un contenido fenólico equivalente al doble obtenido por el método soxhlet.

Otra importante investigación fue la extracción de compuestos fenólicos de la piel y de la semilla desgrasada de uva (cultivar :Pinot Nero) usando agua subcrítica en un modo semicontinuo, a 10 MPa, a 80 y 100 °C (Duba, Casazzab, Mohamed, Perego y Fiori, 2015).

Por otro lado, se ha determinado la capacidad antioxidante, protectora del hepatopáncreas, inducidas por la cáscara y semilla de uva en ratones

(Sandoval, Lazarte y Arnao, 2008), en otro estudio evaluaron la aplicación de los extractos fenólicos en alimentos (Paladino y Zuritz, 2012), quienes obtuvieron  $1143,2 \pm 49,96$  mg de CF/L extracto y extracto concentrado  $36370,7 \pm 2883,56$  mg de fenoles totales, evaluaron la eficiencia antioxidante de los extractos secos y compararon con los antioxidantes de uso habitual como el ácido ascórbico y bisulfito de sodio en jugo de manzana resultando que el extracto concentrado de semillas de vid inhibió la oxidación de jugo de manzanas en un 31.51%; el ácido ascórbico 2.60% y el dióxido de azufre un 97.40 %.

En este trabajo de investigación, como tercer objetivo se planteó evaluar la actividad antifúngica del extracto de compuestos fenólicos, debido a la prevalencia de la afección por hongos reportada en un estudio realizado entre los años 1976-2005, en Lima-Perú donde la población fue 12,990 muestras de pacientes con sospecha clínica de dermatomicosis, 7,185 casos dieron positivo, de las cuales el 33.2% presentaron *T. rubrum*, 9.4% *T. mentagrophytes* y 15.3 % *Candida albicans* (Bejar et al., 2014).

No existen trabajos de investigación relacionados a la actividad antifúngica de extractos de la semilla de uva pisquera de la variedad quebranta contra *Trichophyton rubrum*, *Cándida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*

Sin embargo, hay estudios de la actividad antifúngica in vitro de plantas medicinales, uno de ellos realizado en el Perú, evaluaron 12 extractos etanólicos de 10 plantas medicinales peruanas: *Annona cherimolia* Mill.(hojas), *Annona muricata* L.(corteza y hojas), *Bidens pilosa* L.(partes aéreas), *Hypericum laricifolium* L.(partes aéreas), *Juglans neotropica* Diels(corteza), *Piper spp.* (hojas), *Plantago major* L.(hojas), *Psidium guajava* L.(hojas), *Schinus molle* L.(corteza y hojas) y *Spartium junceum* L. (planta entera), frente a *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* cepa clínica, así como, el hongo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 16404, aplicando los métodos de difusión en agar y dilución en agar para la

determinación de la concentración mínima inhibitoria, concluye que seis extractos presentaron actividad antifúngica con un diámetro de halos de inhibición mayor 18 mm (prueba de difusión en agar) frente a *Candida albicans* ATCC 10231, con 250 µg/mL para *Hypericum laricifolium* L., *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* L. y *Schinus molle* L. (un extracto de corteza y uno de hojas) y de 500µg/mL para *Piper spp* (Huamani y Ruiz, 2005).

En Argentina estudiaron la actividad antifúngica in vitro de extractos de 10 plantas usadas en medicina popular contra *A. níger*, *P. notatum*, *S. cereviceae* y *C. albicans*, las decocciones de *L. divaricata*, *G. gaudichaudianum*, *B. trimera* y *S. terebenthifolius*, presentaron actividad antifúngica sobre *S. cereviceae* con valores de MIC de 100, 250, 100 y 250 mg/ml respectivamente. Las decocciones de *G. gaudichaudianum*, *B. trimera* y *S. terebenthifolius* inhibieron el crecimiento de *C. albicans* con un valor de MIC de 250 mg/ml (Davicino et al., 2007).

En otro trabajo realizado en Colombia evaluaron in vitro la eficiencia del aceite esencial foliar de *Lippia alba* contra *Colletotrichum gloeosporioides*, empleando 500, 1000, 3000 y 10000 ppm del aceite esencial, diluidas en acetona; utilizaron un control positivo con Benomil 1 g/L, un control negativo con acetona y un testigo absoluto; (%I.A). El componente mayoritario del aceite fue el citral (34.62 a 40.03 %), el mayor índice antifúngico se encontró a 10,000 ppm (97.8%) similar a la del Benomil (Pérez, Chamorro y Vitola, 2017).

## **2.3. Bases teóricas**

### **2.3.1.- Taxonomía de la uva**

La uva (vid) pertenece a las Embriofitas, subtipo Angiospermas, clase Dicotiledóneas, subclase Arquiclamídeas, orden Ramnales, familia Vitáceas (Ampelidáceas), genero *Vitis* y especies *Vitis sp* (vinífera). Es una planta perenne con raíces profundas y ramificadas, de tallo tortuoso y de ramas permanentes compuestas por nudos, entrenudos y yemas; estas últimas pueden ser de dos clases: mixtas y estériles. Las hojas son alternas pudiendo ser enteras, lobuladas, divididas o dentadas, consta de tres partes: Pecíolo, brácteas y limbo. Opuestos a cada hoja se encuentran los zarcillos, los cuales sostienen a los brotes. Las flores son pequeñas, verdosas y hermafroditas, consta de cinco sépalos y cinco pétalos unidos por el ápice, y tienen cinco estambres y un ovario con dos cavidades, cada una de las cuales con dos óvulos. El fruto es una baya y consta de epicarpio, mesocarpio y endocarpio. Las semillas son pequeñas, duras de color marrón o negro y en número de una a cuatro (Aguirre, Díaz Pena, Agüero, 1978).

### **2.3.2. Aceite de semilla de uva**

En lo que respecta a legislación o normativas, en Perú no se registra una normativa propia referida al aceite de semilla de uva; sin embargo, el Codex Alimentarius cuenta con la Norma para aceites vegetales, (Codex, 2015), la cual aplica a los aceites vegetales comestibles, dentro de los que figura el aceite de semilla de uva y considera las características físicas y químicas, así como la composición de ácidos grasos del Cuadro 1 y 2.



**Cuadro 1. Características Físicas y Químicas del aceite de semilla de uva.**

Característica	Valor
Densidad relativa (a 20°C)	0.920- 0.926
Índice de refracción (ND 40°C)	1.467- 1.477
Índice de saponificación (mg KOH/g de aceite)	188-194
Índice de yodo	128-150

*Fuente.* Codex, 2015

**Cuadro 2. Ácidos grasos en aceite de semilla de uva.**

Ácido graso	Valor	Ácido graso	Valor	Ácido graso	Valor
C6:0	ND	C17:0	ND-0.2	C20:1	ND-0.3
C8:0	ND	C17:1	ND-0.1	C20:2	ND
C10:0	ND	C18:0	3.0-6.5	C22:0	ND-0.5
C12:0	ND	C18:1	12.0-28.0	C22:1	ND-0.3
C14:0	ND-0.3	C18:2	58.0-78.0	C22:2	ND
C16:0	5.5-11.0	C18:3	ND-1.0	C24:0	ND-0.4
C16:1	ND-1.2	C20:0	ND-1.0	C24:1	ND

*ND: No detectable definido como  $\leq 0.05$  %. Fuente.* Codex, 2015

### **2.3.3 Manejo e impactos específicos en el procesamiento industrial de aceite vegetal.**

Los aspectos ambientales relacionados al procesamiento industrial de aceite vegetal incluyen: los residuos y subproductos sólidos, consumo y gestión del agua, consumo y gestión de la energía, emisiones de aire, emisiones de gases de efecto invernadero, materiales peligrosos. La materia particulada (polvo) y los compuestos orgánicos volátiles (COV) son las principales emisiones derivadas de la producción del aceite vegetal. Las emisiones de COV provienen del uso de disolventes para la extracción del aceite, normalmente el hexano. La presencia de pequeñas cantidades de disolventes en el aceite vegetal crudo puede darse cuando el aceite se ha

extraído empleando disolventes; estas se volatilizan durante el proceso de refinado del aceite, sobre todo durante su desodorización. Algunas de las técnicas recomendadas para prevenir y controlar los COV son, por ejemplo:

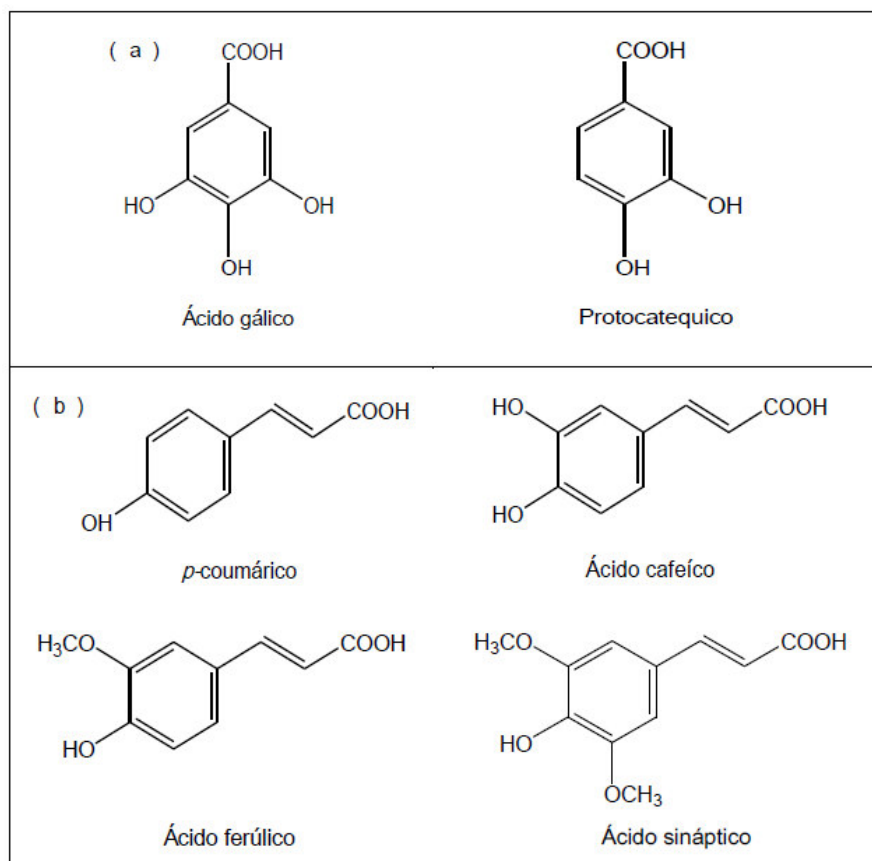
- Optimizar la recuperación de disolventes mediante la destilación del aceite del extractor.
- Emplear una ventilación posterior de las cisternas de suministro de disolvente durante el llenado del tanque de almacenamiento a granel.
- Mejorar los sistemas de recolección de aire de escape. Depurar el aire cargado de hexano del proceso de condensación/evaporación con aceite mineral.
- Aplicar sistemas de prevención de fugas.

Grupo Banco Mundial (2015)

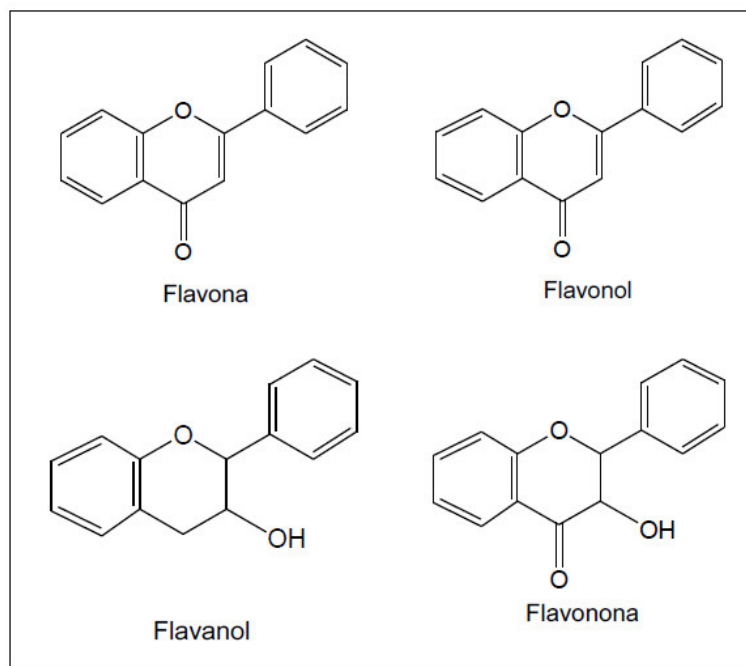
#### **2.3.4. *Compuestos fenólicos***

Los compuestos fenólicos (CF) son los subproductos del metabolismo de las plantas y su número largo de carbono es indicativo de que pueden sufrir varias reacciones de hidroxilación, metoxilación, glucosilación y acilación durante su biosíntesis. Los polifenoles están asociados a características sensoriales como el sabor astringente y dureza; a características nutritivas (asimilación de nutrientes y síntesis proteica) y propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal, como la actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales, alelopatía y defensa ante los factores adversos del ambiente; se clasifican en 3 grupos principales: a) Fenoles simples y Ácidos fenólicos, incluyen al ácido gálico, ácidos caféico, ferúlico, p-cumarico, su estructura se observa en la Figura 1. b) flavonoides, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanoles y antocianidinas, (las antocianinas pertenecen al grupo de metabolitos secundarios dentro de los flavonoides y son los componentes que otorgan los colores rojo, morado y azul presente en las frutas, vegetales y granos, particularmente en frutos, flores y hojas, dichos pigmentos son solubles en agua) en la Figura 2 se observan algunos de ellos. c) derivados del ácido hidroxicinámico (taninos),

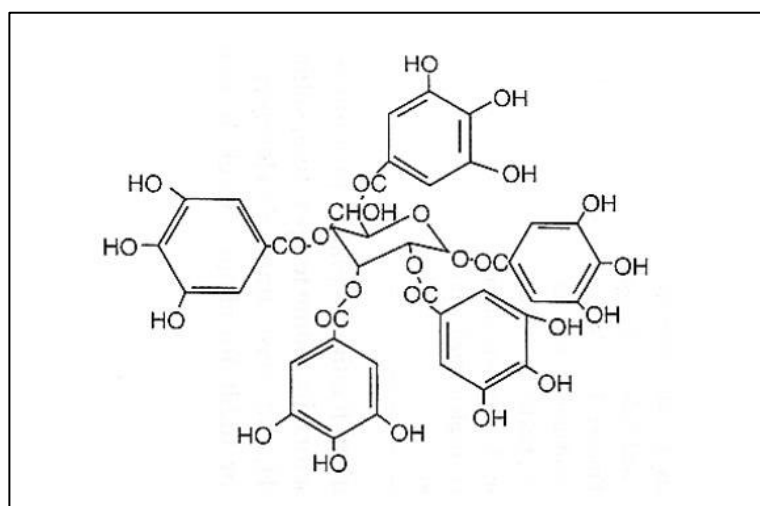
son los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas, tal como se puede observar en la Figura 3 (Cornejo, 2012).



**Figura 1. Estructura de compuestos fenólicos simples.** Fuente.  
Balasundram et. al, 2006



*Figura 2. Estructuras representativas de flavonoides. Fuente. Balasundram et. Al., 2006.*



*Figura 3. Estructura química de un tanino. Fuente. Balasundram et. Al., 2006*

Daglia (2012) define los polifenoles como metabolitos secundarios producidos por grandes plantas, los cuales juegan un rol esencial en la

fisiología de la planta y tiene propiedades potenciales saludables para el organismo humano, principalmente como antioxidantes, antialergénicos, antiinflamatorios, anticancerígenos, antihipertensivos y agentes antimicrobiano, así mismo menciona que los CF tienen actividad antibacterial, antiviral y antifúngica.

### **2.3.5. Actividad Antioxidante.**

La oxidación lipídica es la mayor causa de deterioro de la calidad de alimentos, los lípidos son susceptibles a los procesos oxidativos en la presencia de catalizadores, tales como el calor, luz, enzimas, metales, metaloproteínas y microorganismos dando lugar al desarrollo de malos olores en alimentos y a la pérdida de aminoácidos esenciales, vitaminas solubles en grasas y de moléculas bioactivas (Shahidi & Zhong, 2005). Muchos métodos empleados para el control de la oxidación lipídica usan **antioxidantes** como medio más efectivo, conveniente y económico, los antioxidantes también son usados en áreas relacionadas a la salud para reducir el riesgo de enfermedades debido a su habilidad de proteger el cuerpo del daño oxidativo.

Los **antioxidantes** son sustancias que cuando están presentes en los alimentos a bajas concentraciones en un sustrato oxidable, retrasan, controlan o previenen los procesos oxidativos que conducen al deterioro de los alimentos o la iniciación y propagación de enfermedades degenerativas en el cuerpo, los antioxidantes incluyen eliminadores de radicales libres, inhibidores de oxígeno singlete, inactivadores de productos secundarios de oxidación de lípidos que producen olores rancios, otras especies reactivas al oxígeno (ROS), quelantes de iones metálicos, inhibidores de enzimas prooxidativas entre otros. (Shahidi & Zhong, 2007). Los alimentos vegetales contienen polifenoles, ácido ascórbico, carotenoides, fitoesteroles y antocianinos, todos conocidos por su efecto significativo en la salud humana para combatir y prevenir los efectos negativos de los radicales libres (Ademiluyi, Akpambang y Oboh, 2009), los cuales en exceso conllevan a un estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es una característica común de varios problemas de salud, los extractos de la semilla de uva han ganado interés significativo basado en los resultados prometedores de su actividad antioxidante que protegen al cuerpo del envejecimiento prematuro, enfermedades y decaimientos. Diversos antioxidantes encontrados en los extractos de semilla de uva son compuestos fenólicos, los beneficios farmacológicos y nutracéuticos derivados de la proantocianidina de la semilla de uva se debe a su capacidad de eliminación de radicales libres. Los estudios han demostrado que la proantocianidina (compuesto fenólico) atenúa el riesgo de cáncer y enfermedad cardíaca inhibiendo la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Shi et al., 2003; Nowshehri, Zulfiqar, Mohammad, 2015). Los extractos de proantocianidina provee significativa protección como la vitamina C, E y  $\beta$ -caroteno contra los radicales libres y la peroxidación de lípidos inducida por los radicales libres y daño del ADN en tejidos del hígado y cerebro (Bagchi et al., 2000).

### **2.3.6. Actividad antifúngica.**

En un estudio realizado durante 30 años en Perú, los hongos *Trichophyton rubrum*, *Cándida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*, fueron reportados como agentes patógenos de mayor prevalencia (Bejar et al., 2014). Daglia (2012) menciona que los polifenoles tienen actividad antibacterial, antiviral y antifúngica.

En ese contexto, se consideró como uno de los objetivos de este estudio, evaluar la actividad antifúngica contra el *Trichophyton rubrum*, *Cándida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes* del extracto de semillas de uva variedad quebranta del orujo, residuo de la elaboración del pisco, debido a que el extracto de semillas presentó elevado contenido de compuestos fenólicos.

Los hongos representan para el hombre una fuente de pérdidas a nivel económico, además las enfermedades causadas por estos (micosis) son recurrentes en los pacientes, ya que su tratamiento es prolongado, costoso y con altos efectos secundarios. El aislamiento de moléculas de las plantas constituye una vía para disminuir el uso de aquellos fármacos, la naturaleza química de los metabolitos secundarios podría ejercer varias actividades a la vez, por ejemplo, fungicida y antioxidante. Grupos de metabolitos como los flavonoides, las quinonas, xantonas, cumarinas, alcaloides, entre otros, ofrecen éstos beneficios (García-Hernández, Rivas-Morales y Leos-Rivas, 2016).

Los dermatofitos constituyen un grupo bien definido de hongos filamentosos taxonómicamente relacionados. Originan una variedad de lesiones clínicas llamadas dermatomicosis. El género *Trichophyton* ha aumentado su incidencia en los últimos tiempos. En los años 40 se aislaba en un 23% de las dermatofitosis; para el 2006 fue el agente causal en un 80% de los casos (Rodríguez, Mendoza, Correa y Casares, 2015)

Las infecciones micóticas se presentan frecuentemente en los pacientes inmunodeprimidos, en personas que reciben frecuentes procedimientos invasores, como la hemodiálisis, diálisis y en aquellos con tratamientos prolongados con antibióticos de alto espectro. El aumento de las infecciones por los hongos, unido a la resistencia que han empezado a tener estos agentes a los antimicóticos está llevando a constante búsquedas de alternativas terapéuticas eficaces. Los vegetales sintetizan metabolitos secundarios (fitoanticipinas y las fitoalexinas) que utilizan para defenderse de la infección por agentes fitopatógenos, entre ellos los hongos. Por esta razón dichas moléculas pueden ser candidatas para estudios in vitro contra agentes micóticos implicados en infecciones humanas (Mesa, Bueno y Betancur, 2004).

El *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*), es un hongo productor de una de las micosis superficiales más extendidas llamada tinea

pedís o pie de atleta, este es uno de los problemas sanitarios más importantes en la actualidad, este hongo es de distribución mundial, por lo que es cosmopolita (López & Aguillón, 2015).

La mayoría de las micosis orales son producidas por levaduras del género *Candida*, una gran parte de las candidiasis orales son asintomáticas y es muy probable que la prevalencia de este proceso sea mucho mayor. Son frecuentes en lactantes, ancianos y personas con factores predisponentes generales o locales, la *Candida albicans*, tiene estrategias de supervivencia especialmente en la cavidad oral, cuando la respuesta inmune es deficiente y la respuesta de los tejidos es alterada como barrera primaria (Gallón, 2015).

### **2.3.7. Extracción con Fluido Supercrítico (FSC)**

En el Cuadro 3 se muestran los parámetros físicos de algunos solventes, los valores superiores a las temperaturas y presiones críticas corresponden a la condición supercrítica, en la Figura 4 se puede observar la región correspondiente a los fluidos supercríticos para varios solventes.

Un FSC (líquido o gas) muestra propiedades únicas, diferentes al estado líquido o gaseoso bajo condiciones estándar y tiene la capacidad de disolver compuestos que puede disolver con dificultad o no puede disolver totalmente en el estado gaseoso o líquido. El CO<sub>2</sub> es el fluido supercrítico más utilizado debido a que no es tóxico, no inflamable, no corrosivo, no es costoso, se elimina fácilmente, no deja residuos, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar, se puede trabajar a baja temperatura y por tanto separar compuestos termolábiles ayudando a prevenir la degradación térmica de ciertos componentes químicos del alimento cuando son extraídos.

Las ventajas de los fluidos supercríticos son las siguientes: poseen alto coeficiente de difusión y viscosidad más baja que los líquidos, la ausencia de



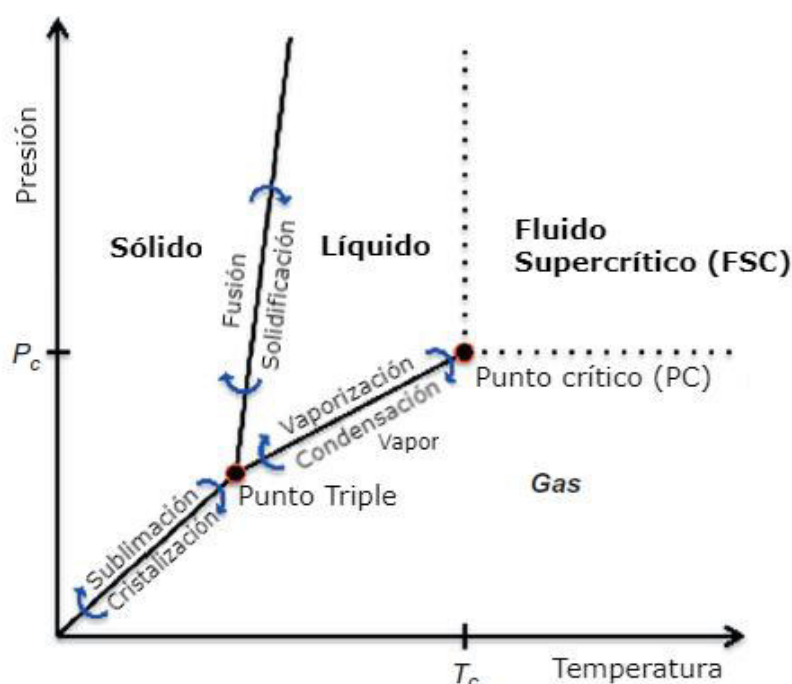
tensión superficial, la cual aumenta la operación de extracción dada la rápida penetración de estos al interior de los poros de la matriz heterogénea. Así mismo, la selectividad durante la extracción puede ser manipulada dada la variación de las diferentes condiciones de operación temperatura y presión afectando la solubilidad de varios componentes en el fluido supercrítico, el CO<sub>2</sub> supercrítico también ha sido usado en innumerables aplicaciones industriales que incluyen diferentes campos como: alimentos, agricultura, acuicultura, pesticidas, procesos microbianos, petroquímica y farmacéutica (Raventós et al., 2002; Goodship & Ogar. 2004).

**Cuadro 3. Parámetros físicos de algunos solventes.**

Compuesto	Punto de ebullición (°C)	Temperatura crítica (°C)	Presión crítica (bar)*	Densidad crítica (g/cm <sup>3</sup> )
Nitrógeno	-195.9	-147.0	34.0	0.314
Etileno	-10.8	9.2	50.4	0.218
Dióxido de carbono	-78.5	31.0	73.8	0.464
Etano	-88.7	32.2	48.8	0.203
Amoníaco	-33.5	132.5	112.8	0.235
Acetona	56.0	235.0	46.9	0.277
Metanol	64.6	239.4	81.0	0.272
Etanol	78.3	243.0	63.8	0.276
Agua	100.0	374.1	220.5	0.322

\*1 bar =14.7 psi =100kPa =0.99 atm

*Fuente.* Goodship & Ogar. 2004



**Figura 4. Diagrama de Presión en función de la temperatura, región Supercrítica** . Fuente. Larissa P. Cunico and Charlotta Turner (2017)

La extracción supercrítica ocurre en dos etapas: la extracción de los compuestos de la matriz sólida y su separación en el solvente supercrítico. Durante la extracción, el solvente fluye a través de la muestra solubilizando los compuestos presentes en la matriz; después de la extracción, ambos el fluido y los compuestos extraídos son pasados a un separador y por la reducción de presión y/o cambio de la temperatura el poder disolvente del fluido supercrítico es reducido y ocurre la separación o fraccionamiento del compuesto (Raventós et al 2002).

La densidad del  $\text{CO}_2$  supercrítico es un parámetro fisicoquímico importante en la extracción. Valores de densidades de  $\text{CO}_2$  de 0.8g/mL o mayores son requeridas en algunas aplicaciones por ejemplo para la extracción de lípidos (Cunico y Turner, 2017; Del valle & De la Fuente, 2006). En el Cuadro 4, en la zona sombreada, se observan los valores de densidad para el  $\text{CO}_2$  supercrítico mayores a 0.8, a diferentes valores de temperatura y presión, cuanto mayor sea la temperatura del  $\text{CO}_2$ , mayor será la presión que

se necesita para lograr la densidad alta (Cunico y Turner, 2017), según el Cuadro 4, en el presente trabajo se requiere extraer aceite a temperatura cercana a 31 °C, le corresponde la presión mayor que 150 Mpa para lograr densidades > 0.8.

**Cuadro 4. Densidad (g/ml) del CO<sub>2</sub> supercrítico en función de la temperatura (°C) y presión (Mpa)**

T (°C)	P (Mpa)						
	7.4	10	20	30	40	50	60
31	0.42	0.76	0.89	0.94	0.99	1.02	1.04
40	0.23	0.62	0.83	0.91	0.96	0.99	1.02
50	0.19	0.38	0.78	0.88	0.92	0.96	0.99
60	0.17	0.29	0.72	0.83	0.89	0.93	0.97
70	0.16	0.25	0.66	0.78	0.86	0.9	0.94
80	0.15	0.22	0.59	0.74	0.82	0.88	0.92
90	0.14	0.21	0.54	0.7	0.79	0.85	0.89
100	0.13	0.19	0.48	0.66	0.76	0.82	0.87

Fuente Datos de Peace Software. [http://www.peacesoftware.de/einigewerte/CO2\\_e.html](http://www.peacesoftware.de/einigewerte/CO2_e.html) (Accesed November, 2015). Valores mayores a 0.8 g/ml están sombreados.

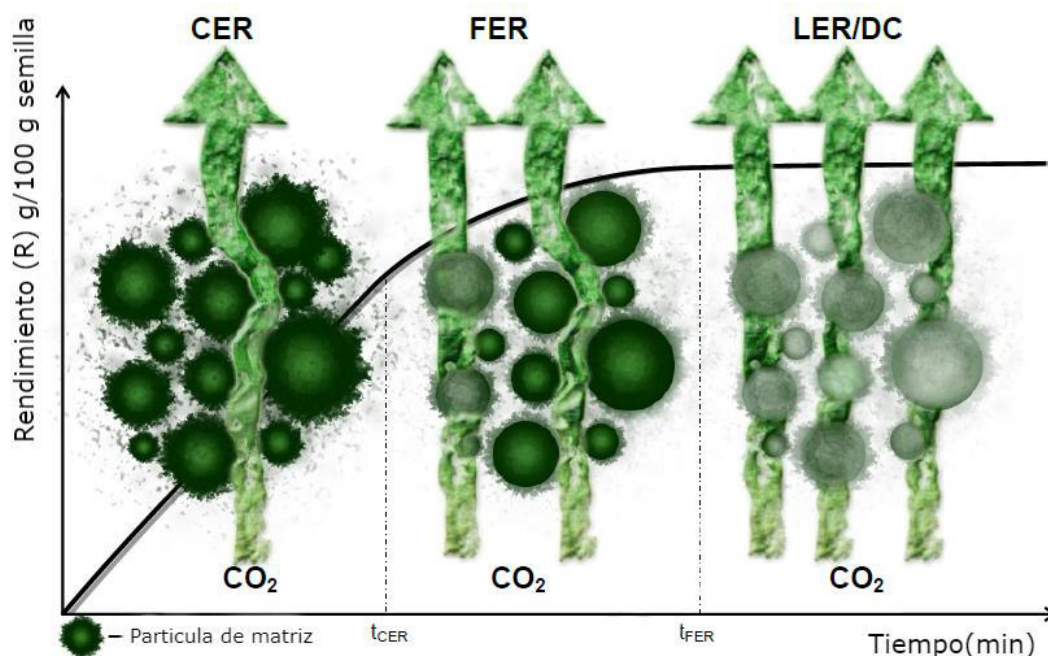
Da Silva et al (2016) mencionan que la curva de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico se divide en tres etapas, tal como se observa en la Figura 5, las cuales están controladas por diferentes mecanismos de transferencia de masa:

a) Periodo de extracción constante (CER, siglas en inglés Constant Extraction Rate), donde la superficie externa de las partículas está cubierta con soluto y la convección es el mecanismo dominante de transferencia de masa;

b) Periodo de caída de la extracción (FER: siglas de Falling Extraction Rate), donde aparecen un quiebre en el contenido de aceite de la superficie externa y el mecanismo de difusión comienza, operando en forma combinada con la convección;

c) Tasa de extracción baja (LER: Low Extraction Rate) o período controlado por difusión (DC), donde la capa externa de aceite prácticamente

desapareció y la transferencia de masa se produce principalmente por difusión dentro de las partículas sólidas.



**Figura 5. Tres periodos diferentes en la curva de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico.**

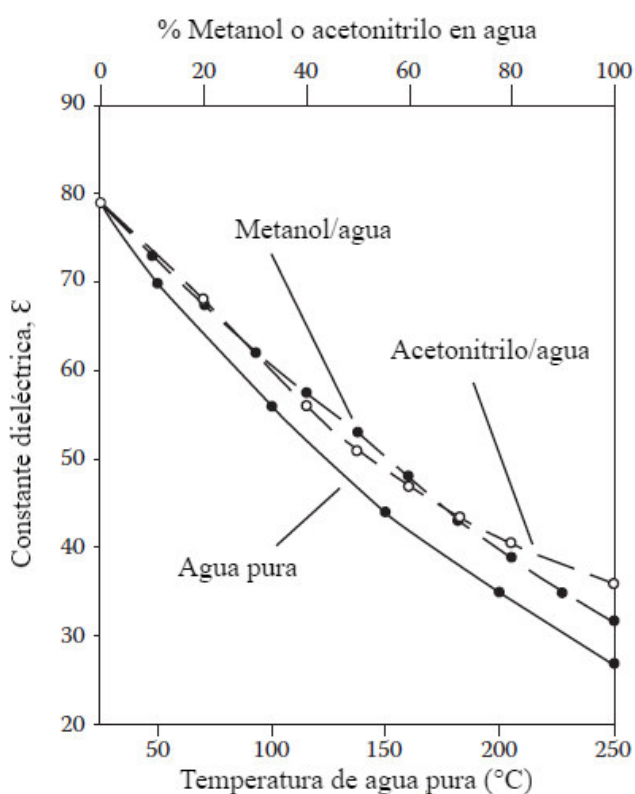
*Fuente.* Da Silva et al., 2016.

### 2.3.8. Extracción con agua subcrítica

La región subcrítica para el agua corresponde a la zona comprendida entre el punto de ebullición y la temperatura crítica (ver Cuadro 3). El efecto más importante al incrementar la temperatura en la extracción con agua caliente presurizada es la debilitación de los enlaces hidrógeno, resultando agua de baja polaridad con una constante dieléctrica baja, (la polaridad del agua depende de la temperatura, los componentes polares a medio-polares se obtiene en el rango de temperaturas de 100-250 °C, y los componentes no polares en el rango de 250-374 °C) . La Figura 6 muestra el

cambio de la constante dieléctrica del agua, como función de la temperatura (25 – 250 °C) a una presión que permita mantener el agua en estado líquido. Además, un incremento en la temperatura promueve la solubilidad, tanto como aumente la energía cinética térmica, facilita la difusión del analito, disminuye la viscosidad del agua y la tensión superficial, pero un efecto menos deseable es el alto grado de degradación térmica de los componentes lábiles (Turner y Ibañez, 2012).

En el presente trabajo se usó la técnica de agua subcrítica, para conseguir una disminución de constante dieléctrica para la extracción de la mayor cantidad de compuestos fenólicos.



**Figura 6. Constante dieléctrica del agua vs la temperatura; y de mezclas de agua con metanol y agua con acetonitrilo.** Fuente. Yang. Y et al., Chromatogr, A810, 149, 1998. With permission citado en Turner y Ibañez (2012)

## 2.4 Marco conceptual

**Acetona:** Es un solvente polar. Se usa en la extracción de algunos productos vegetales y animales.

**Actividad Antifúngica:** capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.

**Actividad antioxidante:** Es la capacidad de los compuestos fenólicos y no fenólicos de disminuir los radicales libres. Se mide comparando con un antioxidante estándar como el trolox o ácido ascórbico.

**Antioxidantes:** son compuestos ricos en electrones, al entrar en reacción con agentes oxidantes donan electrones.

**Compuestos fenólicos,** metabolitos secundarios producidos por las plantas, son antioxidantes.

**DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo):** es un radical libre sintético, usado en un ensayo para medir la capacidad de atrapar radicales libres.

**Estrés oxidativo:** El exceso de radicales libres rompen el equilibrio produciendo el llamado estrés oxidativo en el organismo de humanos y animales.

**Hexano:** Sustancia química manufacturada del petróleo crudo. Debido a su propiedad apolar es usado en la extracción de aceites vegetales.

**Metanol:** Es un líquido incoloro, volátil, inflamable, a diferencia del etanol, es tóxico para el consumo humano. El metanol es polar y facilita la extracción de sustancias polares como los compuestos fenólicos.

**Oxidación,** todo proceso en el que ocurre pérdida de electrones, captación de oxígeno o una cesión de hidrógeno (deshidrogenación) y reducción a aquel otro en el cual se captan electrones o se pierden oxígenos. Todo proceso de oxidación va siempre acompañado de otros de reducción.

**Pisco:** Aguardiente obtenido por destilación de mostos frescos de Uva Pisquera (Quebranta, Negra Criolla, Mollar, Italia, Moscatel, Albilla, Torontel y Uvina) recientemente fermentados utilizando métodos que mantengan el principio tradicional de calidad establecido en las zonas de producción reconocidas (INDECOPI, 2006).

**Radicales libres:** son especies químicas con electrones desapareados en su capa de valencia. En los sistemas biológicos, suelen ser moléculas orgánicas o inorgánicas de vida corta, y pueden causar efectos negativos sobre los lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos.

**Residuo sólido generado en la elaboración de pisco:** Es el orujo, subproducto obtenido luego de la elaboración del pisco: semilla, piel, hollejo. En este trabajo el objeto de estudio es la semilla de uva quebranta de Ica.

**Valor peróxido (POV):** es el valor de peróxidos expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa, cuantifica la oxidación inicial de las grasas.

**Valor de Anisidina:** La p-anisidina reacciona con aldehídos produciendo color amarillo. Cuantifica la oxidación secundaria de las grasas.

**Valor P:** el valor P toma valores en el rango de cero y uno. Si el nivel de significancia establecido en el análisis estadístico es de 5% y resulta un valor  $P < 0.05$  se rechaza la  $H_0$  o se interpreta que existe efecto de esa variable. Para el nivel de significancia de 1% y el valor P es  $< 0.01$  se rechaza la  $H_0$  o se interpreta que existe un efecto.

## 2.5 Hipótesis

### Hipótesis general

El extracto fenólico de la semilla de uva quebranta recuperada del residuo sólido del procesamiento de pisco presenta actividad antioxidante; y antifúngica contra el *Trichophyton rubrum*, *Cándida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*.

### Hipótesis específicas

- 1.- El rendimiento (R) del aceite extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico es mayor que el obtenido con hexano.
- 2.- Por lo menos uno de los extractos fenólicos obtenido de la semilla de uva, con agua subcrítica, metanol, etanol o acetona presenta mayor actividad antioxidante que los otros extractos.
- 3.- El extracto fenólico de la semilla de uva quebranta desgrasada presenta actividad antifúngica (diámetros de halo de inhibición > 18 mm), contra el *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Candida albicans*



## CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

Este trabajo, es una investigación aplicada, con diseño experimental y enfoque cuantitativo, propone una técnica de aprovechamiento de la semilla de uva que forma parte del orujo de la elaboración del pisco.

En un primer momento, durante las pruebas preliminares se realizó la extracción de aceite de semilla de uva debido a que era una interferencia en la extracción de compuestos fenólicos, se determinó la composición de ácidos grasos del aceite y contenían más del 80% de ácidos grasos insaturados, considerándose por ese motivo la extracción de aceite de la semilla como uno de los objetivos, se optimizó su extracción con la CO<sub>2</sub> supercrítico y se evaluó su calidad. A la semilla desgrasada se le realizó la extracción de compuestos fenólicos con agua subcrítica, metanol, etanol y acetona, y fueron medidos la actividad antioxidante y antifúngica de los extractos.

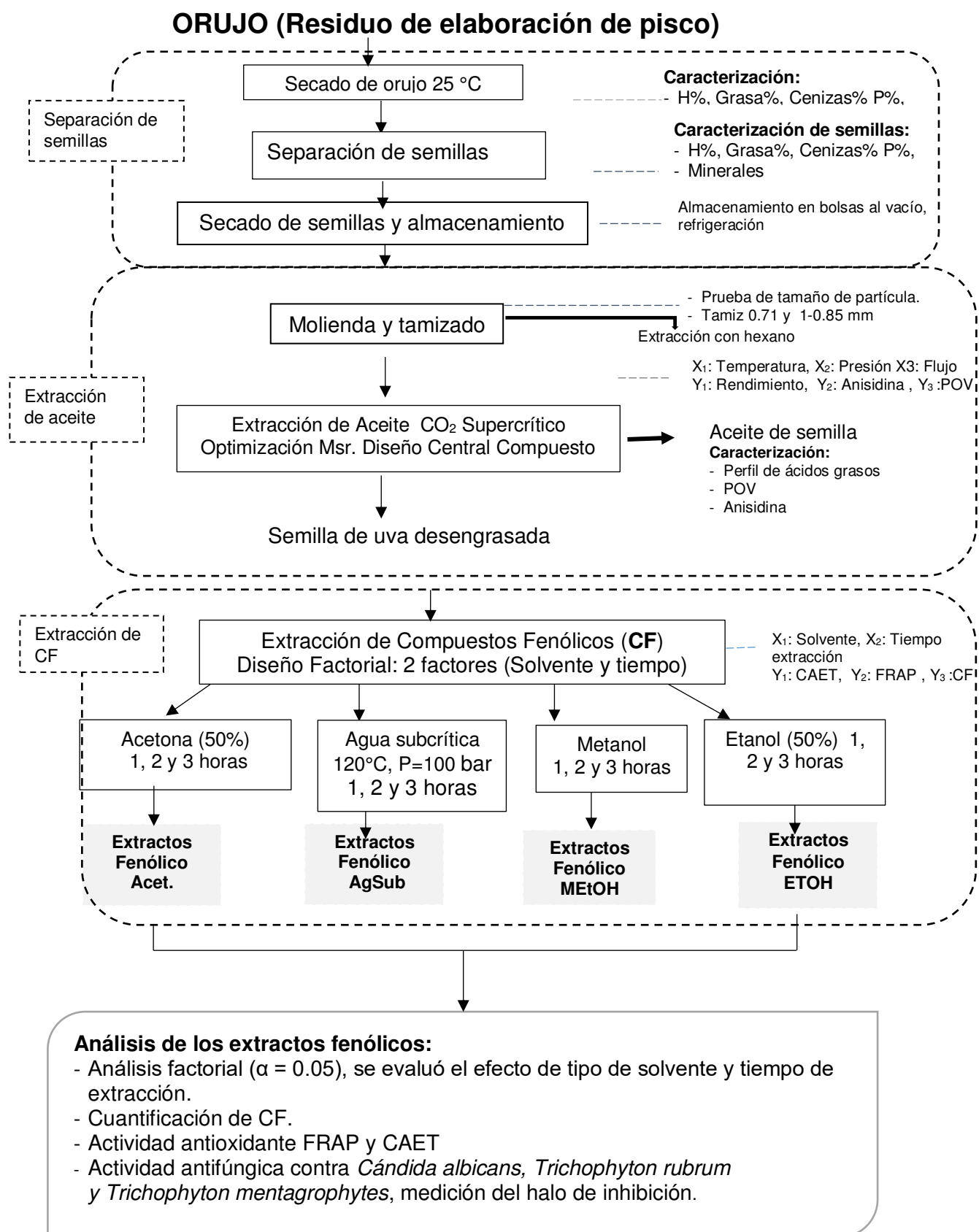
### 3.1 Materia prima

En marzo 2017, se tomaron muestras de uva *Vitis vinifera*, variedad quebranta y de Orujo, residuo sólido de la elaboración de pisco, en dos zonas de producción de pisco, Subtanjalla, Ica (Latitud 14° 1'17.82"S, Longitud 75°44'35.43"O), que pertenece a la empresa Bodega Yanquiza, tienen dos Ha de cultivo de uva, a la que se denominará **Zona A** y de Los Patos, Ica (Latitud 14° 2'56.22"S, Longitud 75°43'52.36"O), tienen 35 Ha de cultivo de uva, pertenece a la Bodega Huarango, a la que se denominará **Zona B**. De cada zona se colectaron aproximadamente 60 kg de orujo fresco (semillas, hollejo y piel de uva), residuo de la elaboración de pisco, se guardaron en bolsas oscuras en refrigeración durante 12 horas, en las instalaciones del Cite

Agroindustrial Ica, se colocó en una caja térmica ( 4-5 °C) con hielo, y se envió al laboratorio de fisicoquímica del Instituto Tecnológico de la Producción (Lima, Perú), el orujo de la **Zona A** fue usado para desarrollar el primer objetivo (Extracción máxima de aceite). El orujo de la Zona B fue empleado para el cumplimiento del segundo y tercer objetivo. El diseño experimental se observa en la Figura 7.

### 3.2. Separación de semilla de uva

El orujo fresco fue deshidratado a 25 °C durante 36 horas en un secador de aire frío Asahi, (Ohiya 1-Chome Nishi-Ku, Japón), hasta una humedad aproximada de  $13 \pm 2\%$ . Se retiró el hollejo y piel de la uva, las semillas se secaron a 40 °C por aproximadamente 6 horas en una estufa de convección forzada (Venticell MM Group, USA) hasta llegar a una humedad de 6 - 7%. Finalmente, las semillas fueron envasadas al vacío (Multivac, USA) en bolsas de polietileno y guardadas en refrigeración ( $5 \pm 1$  °C) en envase oscuro hasta su posterior uso.



**Figura 7. Diseño experimental para obtener aceite y extracto de compuestos fenólicos. Fuente:** Elaboración propia

### 3.3 Análisis químicos de las semillas de uva

- Determinación del contenido de agua según la FAO (1986).
- Determinación del contenido de grasa cruda se realizó según el método de soxhlet (FAO, 1986)
- Determinación de nitrógeno total por el método Kjeldahl (AOAC.
- Determinación de ceniza según FAO (1986)
- Los ensayos fueron realizados por duplicados a la uva, orujo fresco, orujo seco y semillas, previamente homogeneizadas y trituradas con el molino (Ika, A11, USA) .

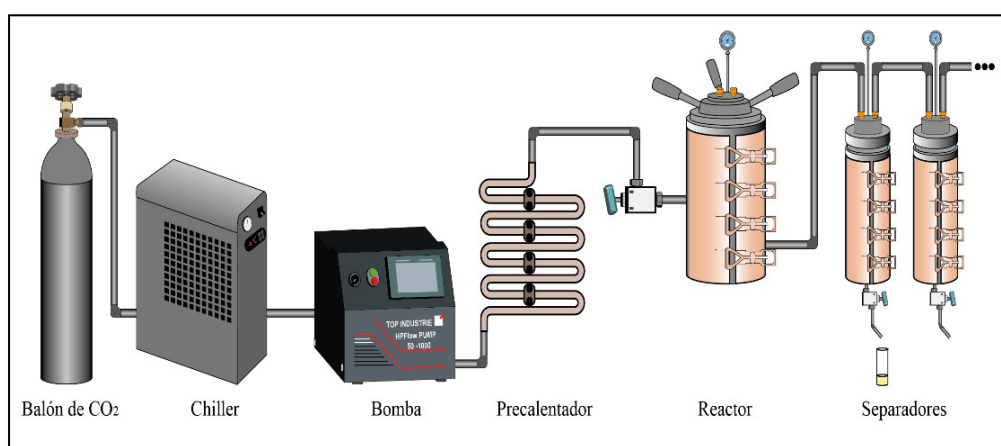
### 3.4 Equipo de extracción multisolvente

El equipo extractor multisolvente Top-Industrie mide 2.40 m x 2.40 m x 0.85 de largo x alto x espesor respectivamente, tiene un panel eléctrico, tres separadores, 1 reactor, valvulas, manómetros, sensores de presión y de temperatura, tiene un software para controlar la temperatura del precalentador, reactor, separadores y registrar las presiones (Figura 8).

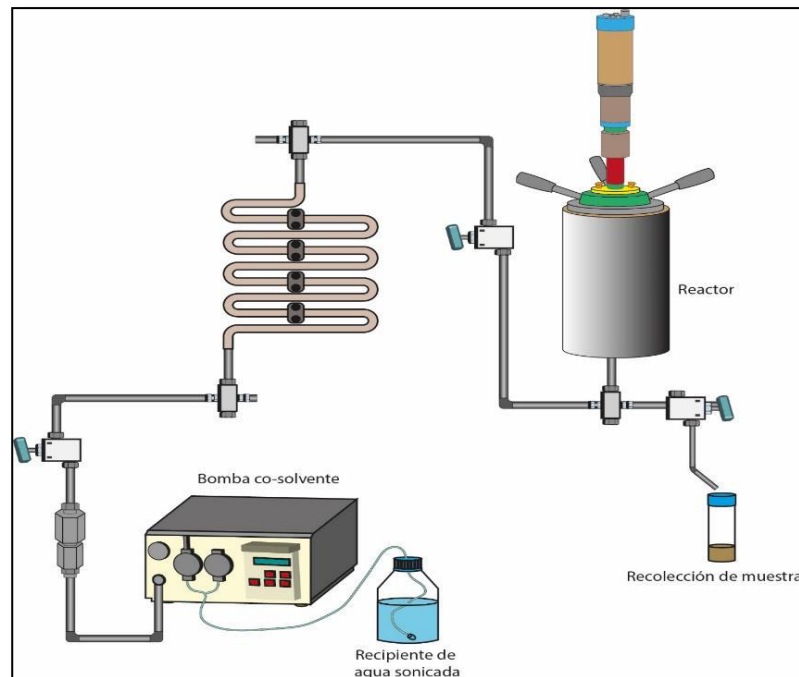
Está diseñado para desarrollar diferentes técnicas de extracción, entre ellas: con CO<sub>2</sub> supercrítico y agua subcrítica. En este trabajo se realizó la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico del aceite, en la Figura 9 se observa el esquema del equipo de extracción. También se usó la extracción de con agua subcrítica de los compuestos fenólicos de la semilla seca y desgrasada (Figura 10).



**Figura 8.- Equipo extractor multisolvente Top-Industrie. Fuente: Elaboracion propia**



**Figura 9. Esquema de la secuencia de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico usando el equipo multisolvente Top-Industrie. Fuente. Elaboracion propia**



**Figura 10.- Esquema de la extracción con agua subcrítica usando el equipo multisolvente Top-Industrie.** Fuente. Elaboración propia

### 3.5 Pruebas estadísticas, pruebas de significancia

Por conveniencia práctica los niveles de probabilidad de 5 % (0.05) y 1 % (0.01) generalmente se usan para decidir si se rechaza o no la hipótesis nula ( $H_0$ ) (Snedecor y Cochran, 1982). En el programa Minitab o SPSS, se selecciona un valor denominado nivel de significancia (generalmente 0.10, 0.05 o 0.01) luego, para evaluar la significancia estadística en el cuadro de los resultados del programa Minitab o SPSS, se examina el valor p. Si el valor p está por debajo de un nivel de significancia ( $\alpha$ ) especificado (generalmente 0.10, 0.05 o 0.01), se puede decir que la diferencia es estadísticamente significativa y rechazar la hipótesis nula de la prueba (Manual del Software Minitab Version 17, Manual software IBM SPSS version 20).

Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de los datos y la prueba de Levene para determinar su homocedasticidad (homogeneidad de varianzas), las dos pruebas fueron realizadas con el programa IBM SPSS luego se realizaron las pruebas paramétricas con el programa Minitab version 17: prueba T de student, diseño y análisis del método de superficie respuesta, anova y comparaciones múltiples de Tukey.

### **3.6 Efecto del tamaño de partícula de la semilla de uva en la extracción de aceite con CO<sub>2</sub> supercrítico.**

Se usó las semillas de uva, residuo de elaboración de pisco de Subtanjalla, se trituró la semilla con un molino (Ika, A11 , USA) y se separaron dos grupos, el primer grupo fue pasado por la malla de 1 mm y se quedó retenido en la malla de 0.85 mm. El segundo grupo fue la semilla que pasó el tamiz que equivale a 0.71 mm (mesh 25). Se realizaron 3 extracciones de cada grupo de semillas a 300 bar, 45 °C y flujo de 70 g/min, se determinó el rendimiento (R) de cada una de las extracciones. Se comparó las medias de los R de los dos grupos de semillas con la T de student.

Se considera en la hipótesis nula ( $H_0$ ) que los promedios de los dos grupos son iguales a un nivel de probabilidad de 1% (0.01), valores de  $P < 0.01$  indican que se rechaza la  $H_0$ , es decir, se acepta la hipótesis alterna ( $H_a$ ), en ese caso los promedios de los dos grupos presentan diferencia significativa

### **3.7 Optimización de la extracción de aceite con CO<sub>2</sub> supercrítico**

Se empleó el software Minitab versión 17, por el método superficie respuesta (MSR), se usó el diseño central compuesto (DCC) con 3 variables independientes: presión (bar), temperatura (°C) y flujo de CO<sub>2</sub> (g/min) los valores mínimo y máximo de cada factor fueron establecidos con pruebas

preliminares y considerando los valores de presión y temperatura supercríticos del CO<sub>2</sub> (Cuadro 3), éstos valores mínimos y máximos fueron colocados en el programa Minitab (Ver Cuadro 5) considerándose 3 réplicas en el punto central, luego el programa establece los niveles por factor (Cuadro 5) y reporta las pruebas a realizarse (Cuadro 6), el valor de  $\alpha$  fue determinado según la ecuación 1 (Montgomery, 2002).

$$\alpha = (2^k)^{1/4} \dots \dots \dots \text{Ecuación (1)}$$

Donde:

k es el número de variables independientes en estudio, reemplazando k=3 en la ecuación (1) el valor de  $\alpha = 1.68$ , se consideró número de réplicas (nr) en el punto central nr=3, por lo tanto, el número de tratamientos se determinó con la ecuación (2).

$$\text{Número de tratamientos} = 2^k + 2k + nr \dots \dots \dots \text{Ecuación (2)}$$

Reemplazando k=3 en la Ecuación (2) se tiene

$$2^3 + 2 \times 3 + 3 = 17 \text{ tratamientos}$$

El DCC del Minitab, se muestra en el Cuadro 6, las 17 pruebas experimentales sugeridas fueron desarrolladas con el equipo extractor multisolvente.

**Cuadro 5. Valores mínimo y máximo de las variables independientes ingresados al Minitab y rangos de niveles establecidos por el Minitab**

Variable			Niveles				
	Mínimo	Máximo	$-\alpha = -1.68$	-1	0	1	$\alpha = 1.68$
Presión A	170	250	142.7	170	210	250	277.3
Temperatura B	40	60	33.2	40	50	60	66.8
Flujo C	30	50	23.2	30	40	50	56.8

*Fuente.* Elaboración propia.



**Cuadro 6. Diseño central compuesto (DCC) para la optimización del rendimiento de aceite de las semillas de uva**

Experimento	A	B	C	Presión (A)	Temperatura (B)	Flujo (C)
1	-1	-1	-1	170	40	30
2	1	-1	-1	250	40	30
3	-1	1	-1	170	60	30
4	1	1	-1	250	60	30
5	-1	-1	1	170	40	50
6	1	-1	1	250	40	50
7	-1	1	1	170	60	50
8	1	1	1	250	60	50
9	-	0	0	142.7	50	40
10	0	0	0	277.3	50	40
11	0	-	0	210	33.2	40
12	0	1.68	0	210	66.8	40
13	0	0	-	210	50	23.2
14	0	0	1.68	210	50	56.8
15	0	0	0	210	50	40
16	0	0	0	210	50	40
17	0	0	0	210	50	40

*Fuente.* Elaboración propia

En la extracción de aceite con CO<sub>2</sub> supercrítico se empleó el equipo extractor multisolvente, marca Top Industries serie 2802.0000 (Francia). En el vaso de extracción de 100 mL (29 mm de diámetro y 147 mm de altura) se pesó  $34 \pm 2$  g de semilla seca y triturada (ms), en forma alternada con la arena químicamente pura (JT Baker, USA) y perlas de vidrio, eso con la finalidad de facilitar la separación de las partículas de las semillas y asegurar el mayor contacto del CO<sub>2</sub> y la semilla.

El vaso de extracción fue colocado en el reactor del equipo extractor, se cerró el reactor, se cubrió con la chaqueta para conservar el calor del reactor, se cerraron y abrieron las válvulas según la ruta establecida por el

manual del equipo, se abrió la llave de CO<sub>2</sub> líquido USP (LINDE, Perú), se dieron las condiciones de temperatura y flujo al software del equipo. Se prendió la bomba de alta presión y con la válvula BPR se llegó a la presión programada (Cuadro 6). Se inició la extracción y se colectó el extracto cada 15 minutos hasta completar 2 horas. Se realizó la misma operación para las pruebas experimentales sugeridas en el DCC del Cuadro 6.

Luego de cada extracción, se obtuvo un extracto oleoso, el cual fue colocado en la centrifuga (Thermo Electron Corporation, USA) a 2500 rpm durante 10 minutos y se separó el aceite.

Se consideraron tres variables dependientes (Y), el valor peróxido, el valor anisidina y el rendimiento (R), éste último obtenido según la ecuación tres:

$$R = \frac{m_{aceite}}{m_{ss}} \times 100 \dots (3)$$

Donde:

R = rendimiento en gramos de aceite por 100 g de semilla seca de uva

$m_{aceite}$  = Peso del aceite

$m_{ss}$  = Peso de la semilla seca

Las determinaciones de valor peróxido y anisidina, permitieron un control de calidad del aceite, de esa manera, se confirma si el proceso de extracción a las condiciones supercríticas afecta o no afecta a la oxidación del aceite.

### 3.8 Extracción con hexano

Se realizó la extracción convencional con hexano durante 6 horas, usando 8 - 10 g de semilla seca y 120 ml de n-hexano en un sistema Soxhlet, los valores de rendimiento, POV y anisidina fueron comparadas con la extracción optimizada con CO<sub>2</sub>. El criterio de calidad para los aceites vegetales tiene como límite 15 miliequivalentes de oxígeno activo /kg aceite (Codex, 2015).

### 3.9 Análisis de Aceite

- ✓ Determinación de valor peróxido (POV) según la AOAC 965.33, (2005)
- ✓ Determinación de anisidina según la NTP 209.217 (Indecopi, 2018) se usó el espectro UV visible Perkin Elmer (Lambda 950, España).
- ✓ Determinación del perfil de ácidos grasos, los ácidos grasos fueron cuantificados según el método de Prevot y Mordret (1976), con el cromatógrafo de gases con detector tipo FID (Perkin Elmer, USA).

### 3.10 Extracción de Compuestos fenólicos con diferentes tipos de solventes

El aceite es una interferencia en esta etapa, porque en la extracción de compuesto fenólicos se formaba una fase de aceite que impide secar los extractos de compuestos fenólicos. Se realizó la extracción aceite con CO<sub>2</sub> supercrítico usando los parámetros optimizados reportados por el Minitab: P=188 bar, T= 33.5 °C, F<sub>CO2</sub>= 56.5 g/min.

El objetivo fue comparar la actividad antioxidante de los extractos de la semilla de uva obtenidos con los diferentes solventes, adicionalmente se determinó los CF para mayor información de los extractos.

No se buscó optimizar, porque para elaborar el diseño superficie respuesta, se requiere que los factores sean variables numéricas (variable que tiene un número contable de valores entre dos valores cualesquiera), además debe colocarse en el programa Minitab un valor numérico mínimo y máximo para cada factor, pero en este caso, uno de los factores es el tipo de solvente, que se trata de una variable categórica, no es numérica, éste tipo de variables pueden no tener un orden lógico.

Para cumplir el objetivo #2 de la tesis, se realizó el diseño full factorial con el programa Minitab. Los factores fueron Factor A: Tipo de solvente:

etanol(EtOH), metanol(MetOH), acetona y agua subcrítica (AguaSub). Factor B: Tiempo de extracción a tres niveles: 1, 2 y 3 horas, se consideró 3 réplicas. Ver Cuadro 7.

**Cuadro 7. Diseño factorial para la extracción de compuestos fenólicos A: solventes; B: Tiempo de extracción**

Experimento	Factor A	Factor B	Solvente	Tiempo
1	1	1	MeOH	1
2	1	2	MeOH	2
3	1	3	MeOH	3
4	2	1	EtOH	1
5	2	2	EtOH	2
6	2	3	EtOH	3
7	3	1	Acetona	1
8	3	2	Acetona	2
9	3	3	Acetona	3
10	4	1	Agua Sub	1
11	4	2	Agua Sub	2
12	4	3	Agua Sub	3
13	1	1	MeOH	1
14	1	2	MeOH	2
15	1	3	MeOH	3
16	2	1	EtOH	1
17	2	2	EtOH	2
18	2	3	EtOH	3
19	3	1	Acetona	1
20	3	2	Acetona	2
21	3	3	Acetona	3
22	4	1	Agua Sub	1
23	4	2	Agua Sub	2
24	4	3	Agua Sub	3
25	1	1	MeOH	1
26	1	2	MeOH	2
27	1	3	MeOH	3
28	2	1	EtOH	1
29	2	2	EtOH	2
30	2	3	EtOH	3
31	3	1	Acetona	1
32	3	2	Acetona	2
33	3	3	Acetona	3
34	4	1	Agua Sub	1
35	4	2	Agua Sub	2
36	4	3	Agua Sub	3

*Fuente.* Elaboración propia

Se determinó el efecto de las variables independientes (Factor A y Factor B) y el efecto combinado de las variables dependientes (Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante), si el valor  $P < 0.05$  presenta efecto significativo.

Para evaluar la diferencia estadística de los CF y capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con los diferentes solventes, se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, luego de cada hora de extracción.

### **3.10.1 Extracción de CF con agua subcrítica**

Se pesaron  $31 \pm 2$  g de semilla de uva desgrasada, se añadió a la celda de extracción una porción de semilla seguido de perlas de vidrio, luego semillas y así sucesivamente, se agregaron un total de  $300 \pm 10$  g de perlas de vidrio en el vaso de extracción y fue colocado en el reactor del equipo extractor multisolvente. Se realizó la extracción a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 100 bar según lo recomendado por Duba, et al., (2015) y flujo de agua de la bomba co-solvente de 15 mL/min.

Luego de llegar a los parámetros establecidos, se apagó la bomba co-solvente durante 20 minutos para asegurar la solubilidad de los compuestos fenólicos y se colectaron las fracciones cada 30 minutos hasta las 3 horas.

### **3.10.2 Extracción de CF con metanol**

Se consideró el uso del metanol según García-Becerra et al., 2016. Con modificación en las proporciones, se pesó 2 g de semilla: 40 mL de metanol y se mantuvieron en un agitador a temperatura ambiente durante 1, 2, 3 horas, luego se filtró con Papel Whatman (0.45  $\mu\text{m}$ ).

### **3.10.3 Extracción de CF con etanol**

Se utilizó el etanol (Nawaz et al., 2006). Se pesó 2 g de semilla: 40 mL de etanol al 70%, los tiempos de extracción fueron 1, 2, 3 horas se filtró con el tamaño de poro de membrana Millipore tipo GS 0.22  $\mu$  m.

### **3.10.4 Extracción de CF con acetona**

Se pesó 2 g de semilla: 40 mL de acetona al 50%, los tiempos de extracción fueron 1, 2, 3 horas se pasó por papel filtro

### **3.10.5 Marcha fitoquímica**

Permite determinar de forma cualitativa aquellos metabolitos secundarios presentes en los extractos, se utilizó la metodología de Lock (2016)

El procedimiento para cada ensayo fue el siguiente:

- Dragendorff (Alcaloides): se evaporó el solvente orgánico del extracto y se disolvió en 1 mL de HCl (1 %), se calentó suavemente y se dejó enfriar. Se añadió tres gotas del reactivo.
- Mayer (Alcaloides): Se evaporó el solvente orgánico del extracto, se disolvió en 1 mL de HCl (1 %), se añadió una pizca de NaCl en polvo, agitar y filtrar, luego se agregó 2- 3 gotas de reactivo.
- Bertrand (Alcaloides): se evaporó el solvente orgánico del extracto, se disolvió en 1 mL de HCl (1 %), se añadió 2- 3 gotas de reactivo.
- Shinoda (Flavonoides): se diluyó extracto con 1 mL de HCl concentrado y se agregó granallas Mg metálico.
- Cloruro férrico (Compuestos fenólicos): se agregó tres gotas de reactivo al extracto seco. A 100 mL de solución se agregó 1 mL de HCl concentrado.
- Gelatina (Taninos): se diluyó el extracto seco con 1 mL de HCl concentrado y se agregó tres gotas de reactivo al 1 %.
- Hipoclorito de sodio (Taninos): se diluyó el extracto seco, con 1 mL de HCl concentrado y se agregaron tres gotas de reactivo.

- Espuma (Saponinas): Una vez evaporado el solvente orgánico del extracto se preparó un extracto acuoso al 1 %, se filtró y se agitó vigorosamente por 30 segundos. La presencia de saponinas es indicada por la formación de una espuma persistente por más de 30 minutos.
- Schiff (Aldehídos y cetonas): Se evaporó el solvente orgánico del extracto, se disolvió en etanol absoluto y se agregó unas gotas del reactivo.
- 2,4 dinitrofenilhidrazina (Aldehídos y cetonas): se diluyó el extracto con 1 mL de HCl concentrado y se agregó unas gotas del reactivo.
- Permanganato de potasio (insaturaciones): Se evaporó el solvente orgánico del extracto, se disolvió en etanol absoluto y se agregó unas gotas del reactivo.

La calificación asignada al término de cada prueba fue la siguiente:

- + + +: Reacción muy evidente.
- + + : Reacción evidente.
- + : Reacción poco evidente pero aceptable.
- : No hubo reacción / reacción negativa.

### 3.11 Determinación de compuestos fenólicos totales

Se siguió el método Folin-Ciocalteu según Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós (1999), se consideraron menores cantidades proporcionalmente, a un tubo se añadió 71 uL de extracto de semilla de uva, luego 71 uL de folin –Ciocalteu, se mezcló, se dejó reposar 3-8 minutos y se le añadió 2 mL de agua destilada y 1430 uL de carbonato de sodio al 7.5 % se llevó al agitador de tubos para lograr la correcta mezcla, se dejó reposar durante 1 hora, se analizó la curva de calibración y la muestra por espectro

UV-V a longitud de onda 750 nm, los resultados se expresaron en gramos equivalentes de ácido gálico/100 g de semilla seca y desgrasada.

### **3.12 Medida de la actividad antioxidante**

#### **3.12.1 *Determinación de FRAP***

La actividad antioxidante se determinó mediante la metodología Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), desarrollada por Benzie & Strain (1996). La curva de calibración se preparó con 2,5 mg de Trolox en 10 mL de metanol al 80%. A partir de esta las concentraciones de 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 0  $\mu$ M. Se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro de UV/VIS (Perkin Elmer, USA) a 595 nm. Se expresaron los resultados por duplicado en unidades de  $\mu$ mol trolox/g de semilla.

#### **3.12.2. *Determinación de capacidad antioxidante en equivalente trolox (CAET) usando DPPH.***

Se siguió el procedimiento de Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) que mide la reducción en absorbancia del radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), a mayor reducción de los radicales libres, mayor actividad antioxidante. Se disolvió el DPPH con metanol puro. Se preparó la curva de la solución patrón de trolox como estándar, el trolox es un potente antioxidante sintético. Finalmente, se determinó la absorbancia de la muestra de extracto de semilla de uva y de las diluciones de trolox. Se expresó la actividad o capacidad antioxidante (CAET) en mg TE/ mg extracto seco, valores mayores



que la unidad indican que el extracto fenólico tiene mayor actividad antioxidante que el trolox.

### **3.13 Medida de Actividad antifúngica**

Las cepas utilizadas fueron: *Cándida albicans*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* del Instituto Nacional de Salud.

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento fúngico, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido y se evidencia por la formación de halos claros alrededor de las colonias.

#### **3.13.1. Preparación del inóculo.**

Para la preparación de la suspensión del inóculo se siguieron los métodos de Huamani y Ruiz (2005); Ruiz (2013), se utilizaron los microorganismos crecidos en agar dextrosa Sabouraud de 48 h para la *Candida albicans*, y de 2-3 semanas para el caso del *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* (Anexo 13). Se suspendió los microorganismos en solución salina (0.85%) estéril y se ajustó la turbidez al equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland para *Candida albicans* y por cámara contadora de células, hasta alcanzar el inóculo deseado ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) y se corrobora por conteo de diluciones seriales en placa.

#### **3.13.2 La preparación e inoculación de las placas.**

Fue realizado en el medio agar dextrosa de Sabouraud previamente reconstituido, esterilizado, enfriado y mantenido a 45 °C, es inoculado con 1 mL de suspensión del inóculo ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) por cada 100 mL de medio de cultivo, homogenizado y distribuido en placas Petri de vidrio estériles de

100 mm de diámetro, a razón de 20 mL por placa. Se dejó solidificar y se rotuló con el nombre del microorganismo testigo (cepas de hongos).

Finalmente se hicieron pozos con la ayuda de un sacabocado de acero de 11 mm de diámetro externo, en cada placa se hizo 2 ó 3 pozos equidistantes (Huamani y Ruiz, 2005; Ruiz, 2013).

### **3.13.3 Adición de las muestras e incubación de las placas**

Para la adición de las muestras e incubación de las placas, se agregó 100 µL de los respectivos extractos (35; 25 y 15 mg/mL) de las diferentes muestras en los pozos, se dejó reposar por 60 minutos a temperatura ambiente y se llevó a incubación a 30 °C por 24 h para *Candida albicans*, de 2-3 semanas a temperatura ambiental para el caso del *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* (Huamani y Ruiz, 2005; Ruiz, 2013; Cano, Bonilla y Roque, 2008). Se realizaron 6 réplicas.

### **3.13.4 Controles**

Control positivo: Fluconazol (0,2 mg/mL) disueltos en DMSO (Dimetilsulfóxido) y agua respectivamente. Las pruebas se realizaron por triplicado. Control negativo: Dimetilsulfóxido.

### **3.13.5 Lectura e interpretación de los resultados**

Se observó las zonas claras de inhibición del crecimiento (halos) y se midió los diámetros en mm.

Se consideró que tiene una actividad antifúngica significativa un halo de inhibición >18 mm (Rojas et al., 2003).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Análisis, interpretación y discusión de los resultados

#### 4.1.1 Caracterización de la uva, orujo y semilla

La composición química de la uva, orujo fresco, orujo seco y semilla seca se muestran en el Cuadro 8.

Los contenidos de aceite o grasa son superiores a los encontrados por Özcan et al. 2012 (5.4 a 10.79 %) pero coinciden con Maier et al., (2009), quienes encontraron contenidos de grasa en semillas de uva en el rango de 7.6 a 16% y de Wen et al., (2016).

Los contenidos de proteínas y cenizas de las semillas de uva, variedad Quebranta de la Zonas A y B se encontraron entre los rangos de Özcan et al. (2012) de 5.24 a 7.54 % y de 1.2 a 2.6 % proteínas y cenizas respectivamente.

**Cuadro 8. Caracterización del orujo fresco, seco y de la semilla (g/100 g de muestra)**

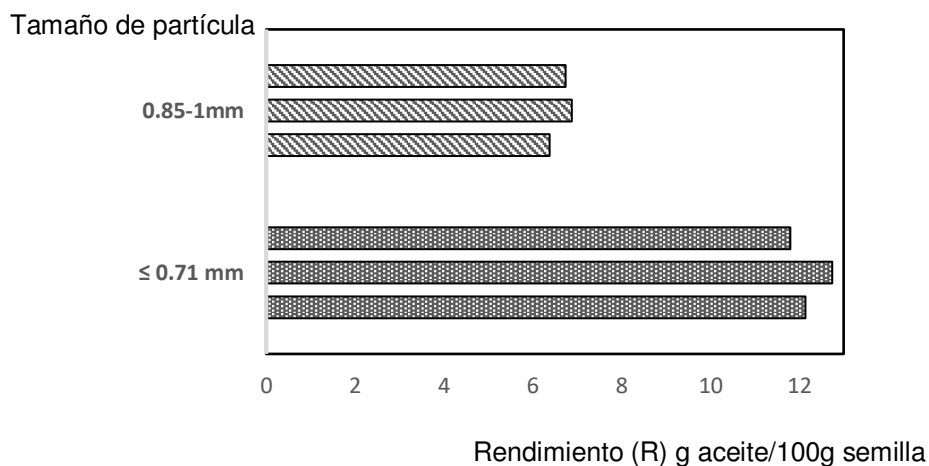
	Zona A (Subtanjalla-Ica)				Zona B (Los Patos-Ica)			
	Uva	Orujo fresco	Orujo seco	Semilla seca	Uva	Orujo fresco	Orujo seco	Semillas seca
Humedad	73.7±0.1	66.3±0.2	11.9±0.1	6.5±0.2	75.2±0.1	72.9±0.1	14.7±0.1	6.1±0.2
Grasa	0.6±0.2	4.3±0.3	3.4±0.2	12.5±0.2	0.3±0.2	1.1±0.2	4.4±0.2	13.1±0.1
Proteína	1.1±0.4	2.8±0.3	10.1±0.2	6.4±0.2	2.1±0.3	1.6±0.4	8.1±0.2	7.0±0.4
Ceniza	2.0±0.0	2.4±0.1	8.1±0.0	2.5±0.1	0.9±0.1	2.5±0.1	7.1±0.0	2.6±0.1

*Fuente:* Propia, realizados en LABS –ITP

#### 4.1.2. Efecto del tamaño de partícula de la semilla de uva en el rendimiento de la extracción de aceite con CO<sub>2</sub> supercrítico.

Los rendimientos obtenidos con diferente tamaño de partícula cumplieron con los supuestos requeridos (Anexo 1, normalidad y homogeneidad de varianzas) para la aplicación de la prueba paramétrica.

La comparación de los promedios de los rendimientos (g aceite/100 g semilla) de aceite obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico a 40°C y 200 bar de dos grupos de semillas con diferente tamaño de partícula, presentaron un Valor Texp = 22.093 y Valor P=0.002, indicando que existe diferencia significativa entre los grupos. La mayor extracción de aceite se logró con partículas de tamaño  $\leq 0.71$  mm (Fig. 11), debido a que al tener menor tamaño la partícula existe mayor superficie de contacto para que el CO<sub>2</sub> solubilice mayor cantidad del aceite de la semilla.



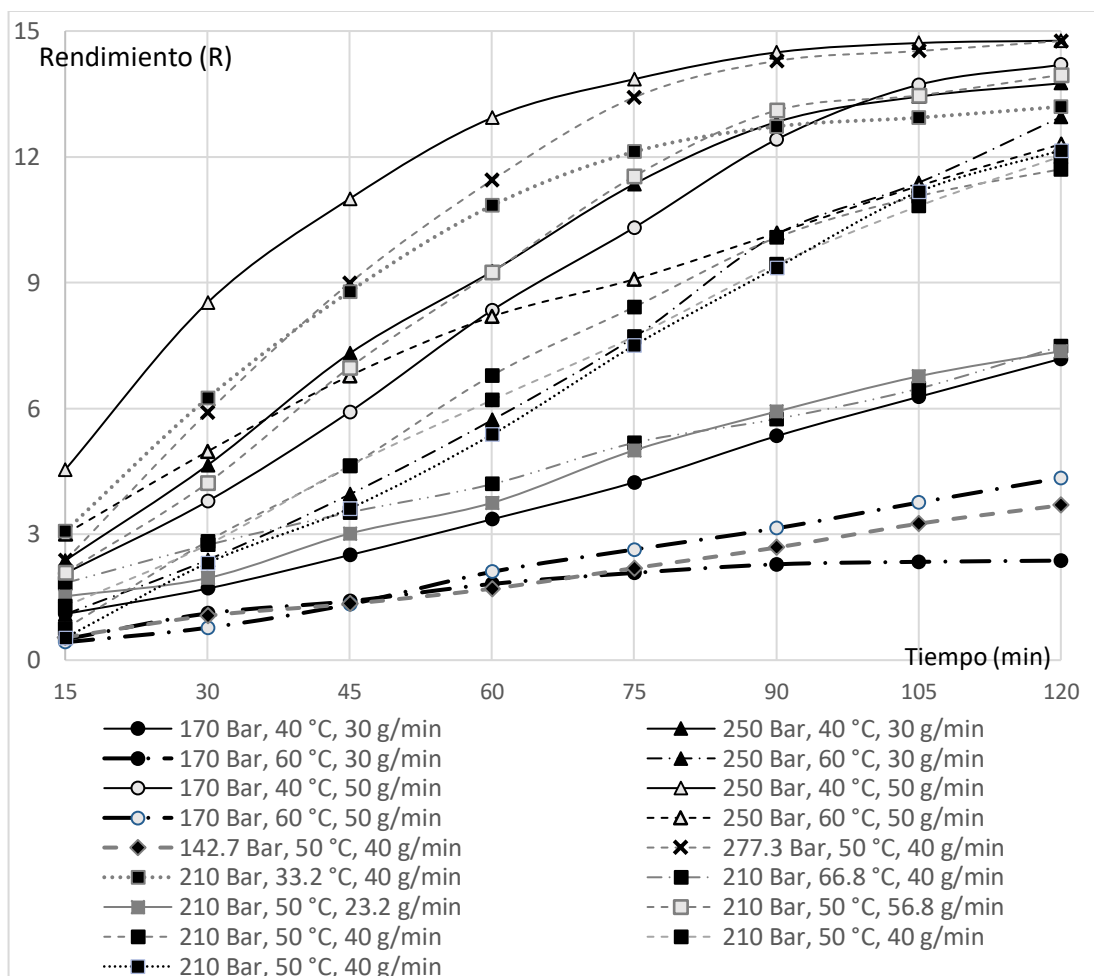
**Figura 11. Contenidos de aceite de las semillas de uva con diferentes tamaños de partícula.** Fuente. Elaboración propia.

Este resultado coincide con Fiori, 2007, quienes evaluaron el rendimiento de extracción de aceite de semilla de uva de 7 tamaños de partículas en el rango de 0.39 a 0.97 mm, el mayor rendimiento lo obtuvieron con las partículas de menor tamaño (0.39; 0.49 y 0.5 mm).

#### **4.1.3 Curvas de extracción de aceite con CO<sub>2</sub> supercrítico.**

Las curvas de extracción de los 17 tratamientos (Figura 12) establecidos en el DCC (Cuadro 6), inician con una tendencia lineal moderadamente ascendente y luego algunas curvas de extracción declinaron y presentaron forma de meseta, aquellas extracciones que lograron extraer poca cantidad de aceite continuaron con la tendencia lineal casi horizontal hasta las dos horas de extracción.

Aquellas curvas que presentaron los mayores rendimientos (170 bar, 40°C y 50 g/min; 210 bar, 33.2°C y 40 g/min; 250 bar; 40 °C y 50 g/min; 277 bar, 50 °C y 40 g/min; 210 bar, 50°C y 56.8 g/min; 250, 40°C y 30 g/min) siguieron los mecanismos de transferencia de masa según lo descrito por Da Silva et al. (2016), estos mecanismos se dividen en tres etapas: a) periodo de extracción constante, b) periodo de la caída de extracción y c) Tasa de extracción baja (Ver Fig. 5).



**Figura 12. Cinética de extracción de aceite con CO<sub>2</sub> supercrítico.**

*Fuente. Elaboración propia*

#### 4.1.4 Análisis del diseño compuesto central DCC

El valor P fue usado para determinar si existe efecto de cada variable independiente. El valor  $P < 0.01$  indica el efecto o interacción de las variables independientes: presión, temperatura y flujo; sobre las variables dependientes: rendimiento, valor peróxido y anisidina (Cuadro 9). Los valores  $P > 0.01$  indican que las variables independientes no tienen efecto sobre las variables dependientes.

**Cuadro 9. Rendimientos, valor de POV y anisidina del aceite de los experimentos del DCC.**

Experimento	Variable independiente			Variable dependiente		
	Presión (bar)	Temper. (°C)	Flujo (g/min)	R g aceite/100g	POV mequivO <sub>2</sub> /kg	Anisidina
1	170	40	30	7.18	0.77	5.32
2	250	40	30	13.75	2.06	3.17
3	170	60	30	2.37	1.88	4.46
4	250	60	30	12.95	1.27	4.34
5	170	40	50	14.19	1.12	4.20
6	250	40	50	14.77	0.48	3.05
7	170	60	50	4.34	0.71	4.32
8	250	60	50	12.30	0.18	3.30
9	142.7	50	40	3.69	0.54	3.70
10	277.3	50	40	14.76	0.68	3.30
11	210	33.2	40	13.20	2.30	2.94
12	210	66.8	40	7.49	2.30	3.20
13	210	50	23.2	7.37	1.19	4.01
14	210	50	56.8	13.95	1.90	2.34
15	210	50	40	11.70	2.34	2.16
16	210	50	40	12.37	1.34	2.31
17	210	50	40	12.01	1.70	2.25

Los datos del rendimiento, POV y anisidina presentaron distribución normal y homogeneidad de varianza (Anexo 2).

El análisis del rendimiento de aceite del DCC (Cuadro 10) muestra que la presión (P), temperatura (T), flujo (F), P<sup>2</sup>, y las interacciones P\*T, P\*F presentaron valor P <0.01, indicando efecto sobre el rendimiento (R).

El análisis de regresión de superficie respuesta reporta el modelo predictivo de optimización (Ecuación 4)

$$R = -48.7 + 0.2549 P - 0.080 T + 1.472 F - 0.000581 P^2 P + 0.003559 P^2 T - 0.002691 P^2 F \dots\dots\dots Ec (4)$$

El coeficiente  $R^2$  del modelo fue de 98.21%, confirmando que el modelo fue altamente significativo, solo el 1.79 % del total de la variación no fue explicada.

A diferencia del presente trabajo, donde la temperatura influyó en el rendimiento de extracción de aceite, Aizpurua et al (2015), mencionaron que la temperatura y tiempo de la extracción con  $\text{CO}_2$  supercrítico no ejercieron efecto en la extracción de aceite en semilla de uva pero que el flujo y presión si fueron significativas para la extracción de ácidos grasos.

**Cuadro 10. ANOVA del diseño de Superficie Respuesta del rendimiento (R) (g aceite/100 g de semilla) versus Presión, temperatura y Flujo (P=0.01)**

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Media cuadrática	Valor F	Valor P
<u>Modelo</u>	9	271.571	30.175	42.78	0
Lineal	3	229.778	76.593	108.59	0
P	1	143.748	143.748	203.8	0
T	1	55.508	55.508	78.7	0
F	1	30.521	30.521	43.27	0
Cuadrático	3	10.682	3.561	5.05	0.036
P*P	1	9.75	9.75	13.82	0.007
T*T	1	3.214	3.214	4.56	0.07
F*F	1	2.013	2.013	2.85	0.135
<u>Interacción</u>	3	31.111	10.37	14.7	0.002
P*T	1	16.217	16.217	22.99	0.002
P*F	1	9.267	9.267	13.14	0.008
T*F	1	5.628	5.628	7.98	0.026
Error	7	4.937	0.705		
Falta de ajuste	5	4.712	0.942	8.38	0.11
Error puro	2	0.225	0.112		
Total	16	276.508			

GL:grados de libertad

Fuente: Elaboración propia

Los indicadores de calidad del aceite no se vieron afectados con la extracción con  $\text{CO}_2$  supercrítico. Los valores de POV fueron menores que el límite establecido por el Codex, (2015) (15 miliequivalentes  $\text{O}_2$ / kg de aceite).



El análisis de varianza del DCC del POV indica que no existe un efecto de la presión, temperatura y flujo, ni efecto combinado entre ellos sobre los Valores peróxido, los valores P fueron mayores que 0.01 (Anexo 3).

No se encontraron referencias de valores de índice de anisidina en aceite de semilla de uva, solo para aceites de pescado, aceites de hígado de pescado, aceites de pescado concentrados, y ésteres etílicos de pescado concentrados donde reportan que debe ser  $\leq 20$  según la norma de la Comisión del Codex (2017) de grasas y aceites.

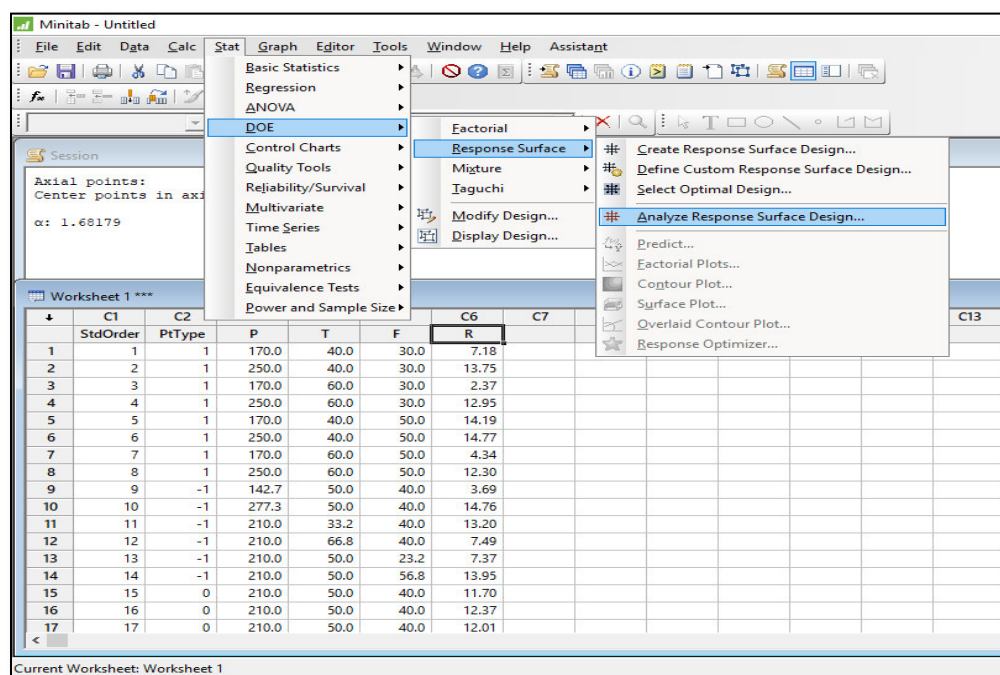
Los valores de índice de anisidina del aceite de semillas de uva Quebranta, extraído por el método convencional (hexano) y con CO<sub>2</sub> supercrítico, se encontraron por debajo del límite (Codex, 2017). El análisis de varianza del diseño superficie respuesta, en el cual se considera como variable dependiente a la anisidina (Anexo 4), indicó que no hubo efectos de la presión, temperatura o flujo, sobre los valores de anisidina del aceite extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico, los valores P fueron mayores que 0.01, tampoco hubo un efecto combinado de esas variables.

#### ***4.1.5 Optimización de la extracción de aceite con CO<sub>2</sub> supercrítico.***

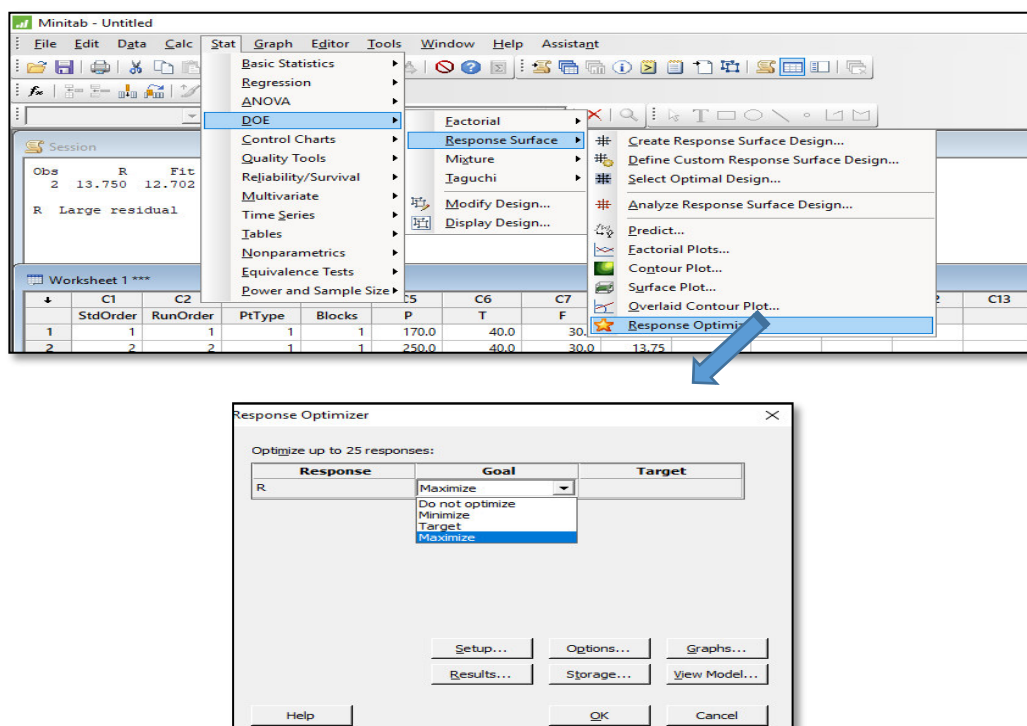
Se siguió el diseño de experimentos conocido como DOE con el método superficie respuesta, se hizo el diseño según lo explicado en el Capítulo 3 (Metodología) subcapítulo 3.7, con los valores mínimos y máximos de las variables independientes (presión, temperatura y flujo de CO<sub>2</sub>) mencionados en el Cuadro 5.

Los 17 valores de la variable respuesta rendimiento (Cuadro 9) fueron colocados en el diseño compuesto central del programa Minitab, se analizó el diseño (Cuadro 11), luego se optimizó la respuesta (Cuadro 12), eligiendo la opción MAXIMIZAR, ver Cuadro 12. El método para maximizar es un proceso para recorrer secuencialmente la trayectoria de la máxima pendiente, que lleva en dirección del máximo aumento de la variable dependiente (Montgomery, 2002)

Cuadro 11. Secuencia del Minitab para el Análisis del diseño superficie respuesta

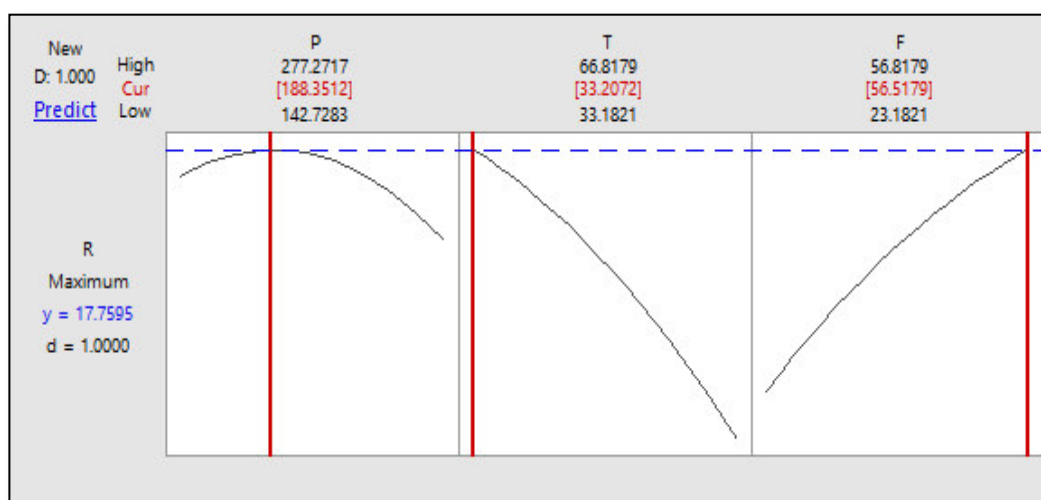


Cuadro 12. Optimización con el método superficie respuesta (Minitab).



Luego de colocar la opción maximizar, el programa Minitab reportó los siguientes valores para cada una de las variables independientes  $P = 188.5$  bar;  $T = 33.2$  °C y  $F = 56.51$  g  $\text{CO}_2$ / min para maximizar el rendimiento de aceite con la extracción con  $\text{CO}_2$  supercrítico, ver Cuadro 13.

Cuadro 13. Resultados de optimización del programa Minitab



Aizpurua et al., (2015) encontraron las condiciones óptimas de extracción con  $\text{CO}_2$  supercrítico a 35 °C, 253 bar, 2 ml/min, con 0.25 g de muestra en 5 min. Necesitarían 700 min para extraer aceite de 35 g de semilla (cantidad usada en esta investigación), tiempo mayor en comparación con el presente trabajo (120 minutos), Aizpurua et al., (2015) necesitarían aproximadamente 1,200 g de  $\text{CO}_2$ , pero en el presente trabajo se usó 3,402 g de  $\text{CO}_2$ .

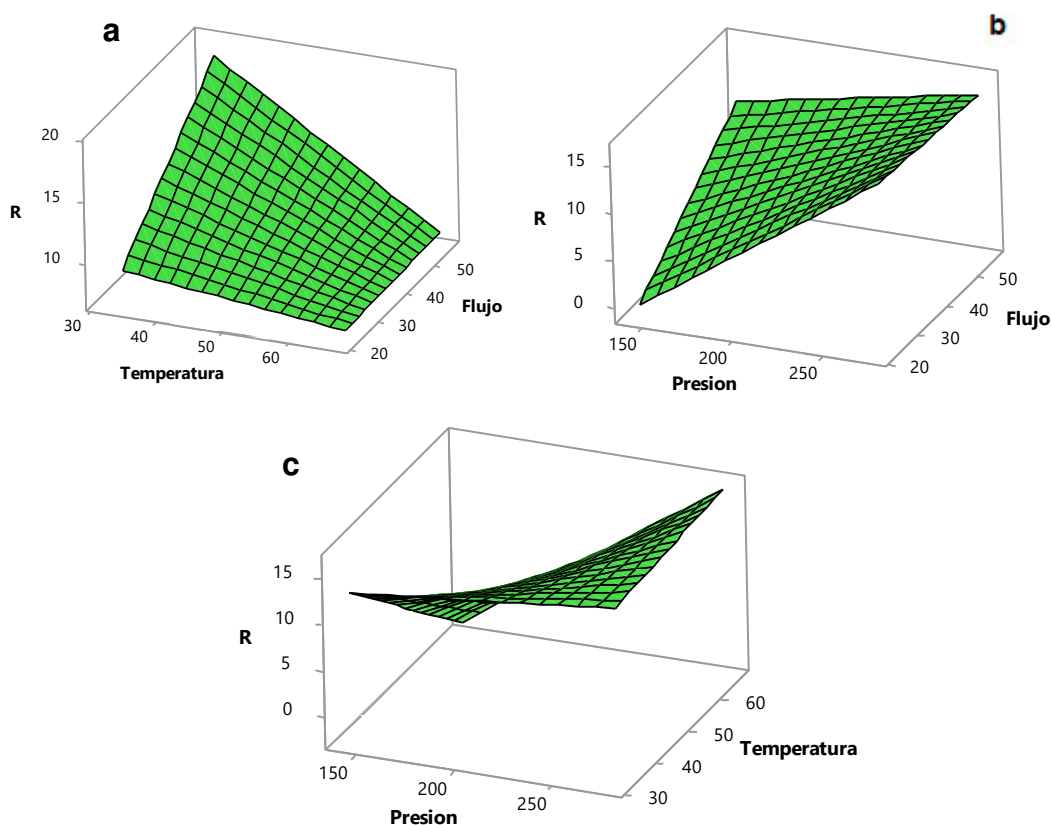
El diagrama de superficie es una grafica de malla tridimensional, que busca explicar el comportamiento de la variable respuesta en función de las dos variables independientes, manteniendo constante la tercera variable independiente. Los diagramas de contorno son similares al diagrama respuesta, en este caso la respuesta se muestra como contornos .

En la Figura 13 se muestran los gráficos de superficie respuesta, en general los mayores valores de rendimientos (R) se lograron a menor temperatura, mayor flujo y mayor presión.

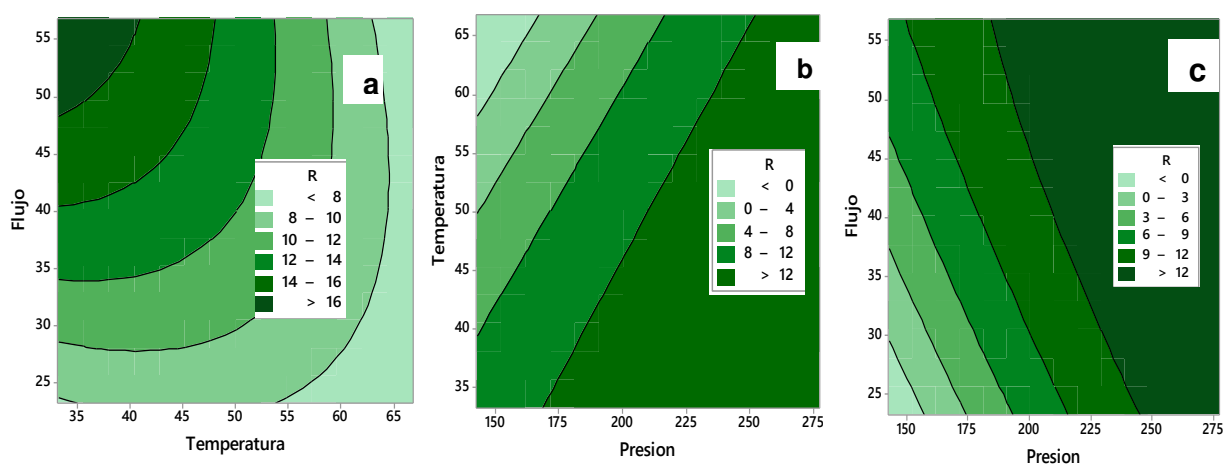
En las Figuras 13a y 14a se observan que a mayores temperaturas ( $>60^{\circ}\text{C}$ ) el rendimiento de extracción de aceite es mínimo o nulo, ni a mayores flujos se mejora el rendimiento, pero a temperaturas menores y valores mayores de flujo de  $\text{CO}_2$  se obtienen mayores rendimientos (R).

En la Figura 13b y 14b se observan que los rendimientos son mínimos o nulo a bajos valores de presión y flujos de  $\text{CO}_2$ , caso contrario sucede a altas presiones y mayores flujos.

En la Figuras 13c y 14c , a altas temperaturas y baja presión el rendimiento es nulo o mínimo, mientras que a baja temperatura y en el rango de estudio de las presiones se obtienen mayores rendimientos. Altas temperaturas requiere mayor presión para lograr mayores extracciones, esto se explica con el efecto de la densidad de  $\text{CO}_2$ , se requiere densidades de  $\text{CO}_2$  de 0.8 g/ml o mayores para la extracción de lípidos (Cunico y Turner 2017; Del Valle y De la Fuente 2006) y esto se logra elevando la presión al tener temperaturas mas altas (ver Cuadro 4).



**Figura 13. Diagrama Superficie respuesta a) Efecto de la T y F a 210 bar. b) Efecto de P y F a 50 °C . c) Efecto de a P y T a 40 g CO<sub>2</sub>/min**

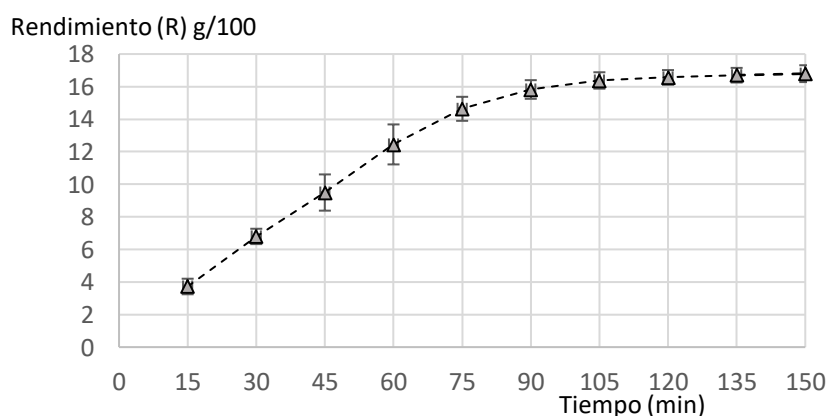


**Figura 14. Diagrama de contorno de rendimiento de aceite a) Efecto del Flujo y Temperatura a 210 bar. b) Efecto de la temperatura y presión a 40 g CO<sub>2</sub>/min c) Efecto del flujo y presión a 50 °C**

#### 4.1.6 Extracción de aceite de la semilla de uva con los parámetros optimizados

Los parámetros optimizados por el programa estadístico Minitab fueron: 188.5 bar, 33.5 °C, 56.5 g de CO<sub>2</sub>/min, con esos parámetros se realizó la extracción de aceite y se obtuvo un rendimiento promedio de 16.5%± 0.4, valor superior a los rendimientos de las 17 extracciones, además superior al contenido de aceite obtenido con hexano (12.5%). La cinética de extracción (Fig. 15) muestra que hasta los 75 minutos la tendencia fue lineal ( $R=1.1768+0.1832$  tiempo; con un coeficiente de determinación  $R^2= 0.9971$ ) y luego siguió una tendencia asintótica como se observa en la Figura 5.

*Densidad de CO<sub>2</sub> supercrítico*, en el Cuadro 4, a 188 bar y 33.2 °C le corresponde un valor de densidad de CO<sub>2</sub> superior que 0.8 g/mL, en el cuadro se observa que a mayores temperaturas se requieren mayores presiones para lograr iguales valores de densidad, por ejemplo a 40 °C y 200 Mpa la densidad es de 0.83 g/ml, si la temperatura fuera incrementada a 60 °C se requiere subir la presión hasta 300 Mpa para lograr la densidad de 0.83 g/ml. En general la solubilidad de muchos compuestos en CO<sub>2</sub> supercrítico depende de la densidad del fluido supercrítico (Del valle y De la Fuente, 2006).



**Figura 15. Extracción de aceite de semilla de uva con parámetros optimizados.** Fuente elaboración propia

#### **4.1.7 Rendimiento, perfil de ácidos grasos, valor peróxido (POV) y anisidina del aceite extraído con CO<sub>2</sub> (parámetros optimizados) y del aceite extraído con hexano**

Los valores de rendimiento de aceite obtenidos con hexano fueron 14.30; 14.6, 14.7, 14.2, 14.7 %, inferior a los rendimientos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico (16.12, 17.1, 17.2, 17.1, 17.5%). Los datos presentaron una distribución normal (Shapiro Wilk) y homogeneidad de varianza (prueba de Levene), ver Anexo 5.

Los ácidos grasos cuantificados en el aceite de semilla de uva estuvieron en el siguiente orden de mayor a menor: linoleico (18:2), oleico (18:1), palmítico (16:0), esteárico (18:0) y en pequeñas cantidades el linolénico (18:3) (Cuadro 14), los contenidos de ácidos grasos extraídos con CO<sub>2</sub> supercrítico y con hexano no presentaron diferencia significativa (valor  $P > 0.01$ ) entre ellos. Estuvieron en el rango establecido en el Cuadro 2; Passos et al. (2010); Özcan et al. (2012); Mieres et al. (2012); Fernandes et al.(2013).

**Cuadro 14. Perfil de los ácidos grasos del aceite de la semilla de uva quebranta extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico y con hexano**

Ácido graso	Extracciones (g/100g aceite)	
	CO <sub>2</sub> supercrítico	Hexano
C 16:0 (Palmítico)	6.71±0.2	7.52±0.4
C 18:0 (Esteárico)	4.81± 0.3	4.44±0.5
C 18:1 w-9 (Oleico)	20.17±0.3	19.65±0.4
C 18:2 w-6 (Linoleico) *	66.69± 0.9	66.69±0.4
C 18:3 w-3 (α-Linolénico)	0.31±0.1	0.30±0.1
C 20:0 (Araquídico)	0.21±0.1	0.16±0.1

*Fuente. Elaboracion propia*

Los valores de POV y anisidina del aceite extraído a 188.5 bar, 33.5 °C y 56.5 g de CO<sub>2</sub>/min (parámetros optimizados), estuvieron dentro del límite establecido por el Codex, 2015 (15 miliequivalentes oxígeno/ kg de aceite), pero, los valores de POV del aceite extraído con hexano fueron mayores (52

miliequivalentes oxígeno/ kg de aceite) que el límite establecido, debido a la prolongada exposición del aceite a alta temperatura, que perjudica la estabilidad oxidativa de ácidos grasos insaturados que forman cerca del 86 % de los ácidos grasos totales del aceite de semilla de uva variedad quebranta.

Mieres et al., 2012, encontraron valores de índice de peróxido de  $44 \pm 2$  mg KOH/g, mencionaron que ese valor es debido a que el aceite ha sufrido un acelerado proceso de oxidación de los ácidos grasos insaturados presentes en el aceite.

**Cuadro 15. Valores de POV y Anisidina del aceite extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico (optimizado) y con hexano.**

Característica	miliequivalentes oxígeno/ kg de aceite		Valor de Anisidina (sin unidades)	
	CO <sub>2</sub>	Hexano	CO <sub>2</sub>	Hexano
Valor 1	2.34	51.1	2.16	3.3
Valor 2	2.45	52.9	2.44	3.8
Prom $\pm$ Desv	2.40 $\pm$ 0.08	52.0 $\pm$ 1.27	2.30 $\pm$ 0.19	3.6 $\pm$ 0.36

Prom= promedio; Desv= desviación estándar

#### **4.1.8 Compuesto fenólico del extracto de semilla desgrasada.**

Los valores de CF (EAG/100g) de los extractos de las semillas de uva desgrasadas se muestran en el Cuadro 16. Los datos presentaron distribución normal y homogeneidad de varianza (Anexo 6). Las hipótesis fueron:

**Ho:** Los extractos obtenidos de la semilla de uva, con agua subcrítica, metanol, etanol o acetona tiene igual contenido de compuestos fenólicos (CF).

**Ha:** Por lo menos uno de los extractos obtenidos de la semilla de uva, tiene mayor contenido de CF que los otros extractos.



El análisis factorial (Cuadro 17) realizado a un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05, indica que el solvente y tiempo de extracción ejercieron efecto sobre la cantidad de CF extraídos de las semillas (valor  $P = 0$ ) y hubo interacción entre el tipo de solvente y tiempo de extracción sobre el contenido de los CF (valor  $P = 0$ ), ver Anexos 10 y 11, así mismo, el  $R^2$  fue de 95.48% confirmando así que el modelo fue altamente significativo y que el 4.52% de la variación no fue explicada. La ecuación del modelo factorial es:

$$\begin{aligned} CF = & 11.195 - 1.523 S\_MeOH - 1.600 S\_EtOH + 2.747 S\_Acet + 0.376 S\_ASub - 1.954 T\_1 \\ & + 0.649 T\_2 + 1.306 T\_3 + 1.582 S*T\_MeOH\_1 - 0.601 S*T\_MeOH\_2 - 0.981 S*T\_MeOH\_3 \\ & + 1.342 S*T\_EtOH\_1 - 0.514 S*T\_EtOH\_2 - 0.828 S*T\_EtOH\_3 + 0.759 S*T\_Acet\_1 \\ & - 0.394 S*T\_Acet\_2 - 0.364 S*T\_Acet\_3 - 3.683 S*T\_ASub\_1 + 1.510 S*T\_ASub\_2 \\ & + 2.173 S*T\_ASub\_3 \dots\dots\dots(Ecuación 5) \end{aligned}$$

Donde:

S: solvente; T: tiempo de extracción; 1: 1 hora; 2 : 2 horas; 3 : 3 horas

La prueba de comparación múltiple indicó luego de 1, 2 y 3 horas de extracción los CF, los extractos de etanol y metanol no presentaron diferencia significativa en el contenido de CF.

Los extractos de acetona y de agua subcrítica, luego de una hora de extracción presentaron diferencia significativa en el contenido de CF, pero a las dos y tres horas no presentaron diferencia significativa (Cuadro 18 y Anexo 7).

Los valores de CF estuvieron dentro del rango encontrado por Karvela et al., 2009 (9.53 - 14.67 g EAG / 100g semilla seca) y Bozan, Tosun, Ozcan, 2008 (7.9 to 15.46 g EAG /100 g), los mayores valores de CF se encontraron en los extractos de acetona y agua subcrítica y fueron superiores a los encontrados por Nawaz et al., 2006, quienes encontraron cantidades de 11.4% del peso total de las semillas de uva en extracto etanólico, y a los valores de Paladino y Zuritz (2011) en semilla Cabernet Sauvignon (proveniente de la vinificación), quienes obtuvieron 1.25 g /100g materia seca al extraer con agua a 90 °C, con la acetona, metanol y etanol obtuvieron 0.726; 0.096 y 0.08 g/100 g de materia seca, respectivamente.

**Cuadro 16. Diseño factorial y las variables respuesta: valores de Compuestos fenólicos expresado en equivalente de ácido gálico/ 100 g de semilla seca y capacidad antioxidante: FRAP y CAET.**

Experimento	Solvente	Tiempo (h)	(EAG/100g)	FRAP (umol trolox/g de semilla)	CAET (mg TE/mg extracto seco)
1	MetOH	1	9.70	897.85	0.86
2	MetOH	2	9.86	917.98	0.94
3	MetOH	3	9.99	1058.55	1.10
4	EtOH	1	9.30	974.51	0.94
5	EtOH	2	10.13	1032.90	1.02
6	EtOH	3	10.65	1010.02	1.26
7	Acetona	1	12.68	1090.68	0.57
8	Acetona	2	13.93	1195.14	0.87
9	Acetona	3	13.84	1089.06	1.65
10	AguaSub	1	6.24	652.25	0.42
11	AguaSub	2	14.73	1284.39	0.72
12	AguaSub	3	15.07	1330.42	0.83
13	MetOH	1	9.96	879.08	0.83
14	MetOH	2	9.93	932.05	0.84
15	MetOH	3	9.63	1024.13	1.27
16	EtOH	1	9.50	957.00	0.92
17	EtOH	2	9.93	1029.47	0.97
18	EtOH	3	10.25	994.65	1.14
19	Acetona	1	12.69	1064.11	0.58
20	Acetona	2	13.93	1156.07	0.85
21	Acetona	3	14.90	1122.19	1.64
22	AguaSub	1	6.16	625.47	0.55
23	AguaSub	2	14.46	1297.44	0.74
24	AguaSub	3	14.58	1356.29	0.89
25	MetOH	1	8.24	857.30	0.93
26	MetOH	2	9.37	995.65	0.94
27	MetOH	3	10.37	1016.59	0.96
28	EtOH	1	8.15	1054.63	0.99
29	EtOH	2	9.13	1126.75	1.01
30	EtOH	3	9.32	1138.33	1.12
31	Acetona	1	12.87	1152.07	0.80
32	Acetona	2	14.73	1181.10	1.10
33	Acetona	3	15.91	1190.23	1.31
34	AguaSub	1	5.40	630.21	0.65
35	AguaSub	2	12.00	1295.00	0.85
36	AguaSub	3	15.50	1301.00	1.10

*Fuente: Elaboracion propia*

**Cuadro 17. Análisis del diseño factorial de los CF de los extractos en función de los Solventes y tiempo de extracción ( $\alpha=0.05$ )**

Fuente	GL	SC Ajust	MC Ajust	Valor F	Valor P
<u>Modelo</u>	11	268.47	24.4067	46.11	0
<u>Lineal</u>	5	184.43	36.8854	69.68	0
Solventes	3	113.09	37.6973	71.22	0
Tiempo extracción	2	71.33	35.6674	67.38	0
<u>Interacciones de 2 términos</u>	6	84.05	14.0079	26.46	0
Solvente *Tiempo extracción	6	84.05	14.0079	26.46	0
Error	24	12.70	0.5293		
Total	35	281.18			

*Fuente.* Elaboracion propia

**Cuadro 18. Promedios y desviación estándar de los CF en equivalente de ácido gálico/ 100 g de semilla seca.**

Horas	MetOH	EtOH	Acetona	AguaSub
1	9.30 <sup>b</sup> ± 0.93	8.98 <sup>b</sup> ± 0.73	12.75 <sup>a</sup> ± 0.11	5.93 <sup>c</sup> ± 0.46
2	9.72 <sup>b</sup> ± 0.31	9.73 <sup>b</sup> ± 0.53	14.20 <sup>a</sup> ± 0.46	13.73 <sup>a</sup> ± 1.50
3	10.00 <sup>b</sup> ± 0.37	10.07 <sup>b</sup> ± 0.68	14.88 <sup>a</sup> ± 1.04	15.05 <sup>a</sup> ± 0.46

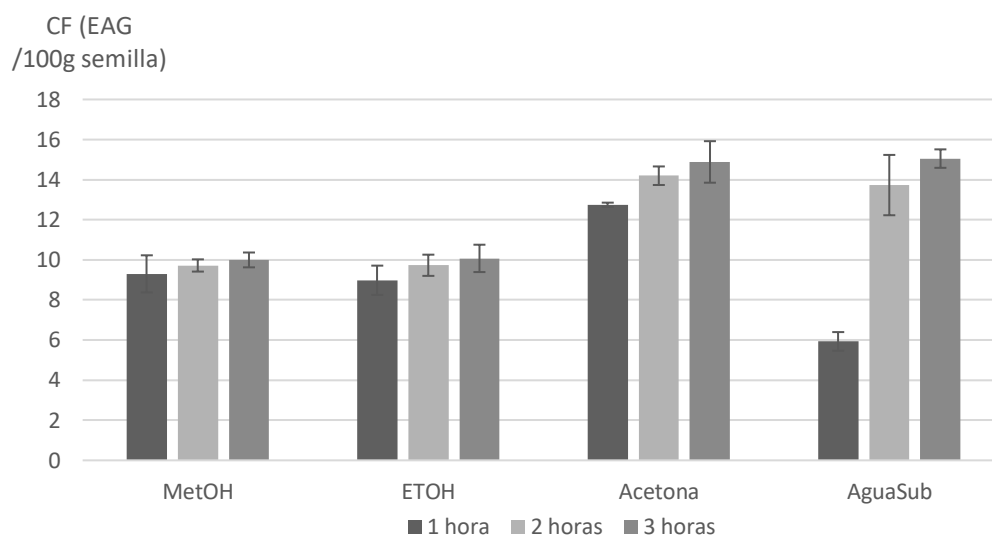
Letras diferentes en cada fila indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

Letras iguales en cada fila indica que no hay diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ )

(Ver anexo 7) **Fuente.** Elaboracion propia

En la Figura 16, se observa que los mayores valores de CF se obtuvieron con acetona desde la primera hora de extracción y con agua subcrítica a las 2 y 3 horas, la extracción con acetona y con agua subcrítica a las 2 y 3 horas presentaron contenidos de CF sin diferencia significativa, su explicación radica en las propiedades fisicoquímicas del agua subcrítica, las cuales son diferentes al agua líquida al medio ambiente, debido que el incremento de la temperatura promueve la solubilidad y facilita la difusión del analito, disminuye la viscosidad y la tensión superficial y disminuye la constante dieléctrica (Turner e Ibáñez, 2012). Con la constante dieléctrica disminuida, el agua cercana al punto crítico se comporta como los solventes orgánicos polares, y

no tanto como el agua líquida a condiciones ambientales (Uematsu y Franck, 1980).



**Figura 16. Contenido de CF en EAG/100g de semilla desgrasada de uva con diferente solvente a 1, 2 y 3 h de extracción**

#### 4.1.9 Actividad antioxidante del extracto de semilla desgrasada

**4.1.9.1 Reducción del complejo férrico a ferroso (FRAP).** el análisis FRAP se basa en la capacidad de ciertos compuestos de reducir el complejo férrico a complejo ferroso por la acción de antioxidantes donadores de electrones. Mientras mayor sea su valor, mayor capacidad antioxidante tiene el extracto. Los datos (Cuadro 16) presentaron distribución normal y homogeneidad de varianza (Anexo 6).

Las hipótesis son nombradas en el acápite de Contrastación de hipótesis.

En el Cuadro 19 puede observarse el análisis de Diseño factorial de FRAP. El solvente y tiempo de extracción ejercen efecto sobre la capacidad antioxidante (FRAP) de los extractos de semilla además hay un efecto combinado del solvente y tiempo de extracción sobre los valores de FRAP, ver Anexos 10 y 11.

El coeficiente  $R^2$  del modelo fue de 96.47%, confirmando que el modelo fue altamente significativo, solo el 3.53% del total de la variación no fue explicada.

La ecuación del modelo factorial es la siguiente :

$$\begin{aligned} \text{FRAP} = & 1053.07 - 99.8 \text{ S\_MeOH} - 17.7 \text{ S\_EtOH} + 84.8 \text{ S\_Acet} + 32.8 \text{ S\_ASub} \\ & - 150.14 \text{ T\_1} + 67.26 \text{ T\_2} + 82.88 \text{ T\_3} + 75.0 \text{ S*T\_MeOH}_1 - 71.9 \text{ S*T\_MeOH}_2 \\ & - 3.0 \text{ S*T\_MeOH}_3 + 110.2 \text{ S*T\_EtOH}_1 - 39.6 \text{ S*T\_EtOH}_2 - 70.6 \text{ S*T\_EtOH}_3 \\ & + 114.6 \text{ S*T\_Acet}_1 - 27.7 \text{ S*T\_Acet}_2 - 86.9 \text{ S*T\_Acet}_3 - 299.7 \text{ S*T\_ASub}_1 \\ & + 139.2 \text{ S*T\_ASub}_2 + 160.5 \text{ S*T\_ASub}_3 \dots\dots\dots \text{Ecuación 6} \end{aligned}$$

Donde:

S: solvent; T: tiempo de extracción; 1: 1 hora; 2 : 2 horas; 3 : 3 horas

**Cuadro 19. Análisis del diseño factorial de los valores de FRAP de los extractos en función de los Solventes y tiempo de extracción ( $\alpha=0.05$ )**

Fuente	GL	Adj SS	Adj MS	Valor F	Valor P
Modelo	11	1131799	102891	59.62	0
<u>Lineal</u>	5	574087	114817	66.53	0
Solvente	3	166860	55620	32.23	0
Tiempo	2	407227	203613	117.98	0
<u>Interacción</u>	6	557712	92952	53.86	0
Solvente *Tiempo	6	557712	92952	53.86	0
Error	24	41421	1726		
Total	35	1173220			

*Fuente. Elaboracion propia*

En la primera y segunda hora de extracción, los valores promedio de FRAP de los extractos presentaron diferencia significativa entre ellos (Cuadro 20, Anexo 8), en la primera hora el extracto con acetona presentó la mayor actividad antioxidante, en la segunda y tercera hora el extracto con agua subcrítica tiene la mayor actividad antioxidante en comparación con los otros extractos (Figura 17), indicando mayor capacidad para reducir el complejo férrico al complejo ferroso por la acción de donadores de electrones.

Maier et al (2009) encontraron valores de FRAP en el rango de 48.49 a 104.80 mol ET/100g de semilla seca de la variedad Spatburgunder, en este trabajo se encontraron valores similares luego de las 3 horas de extracción, con Metanol y etanol (103.3 y 104.7 mol ET/100g de semilla seca y desgrasada respectivamente), y valores superiores con acetona y agua subcritica (113.3 y 132.9 mol ET/100g de semilla seca y desgrasada respectivamente)

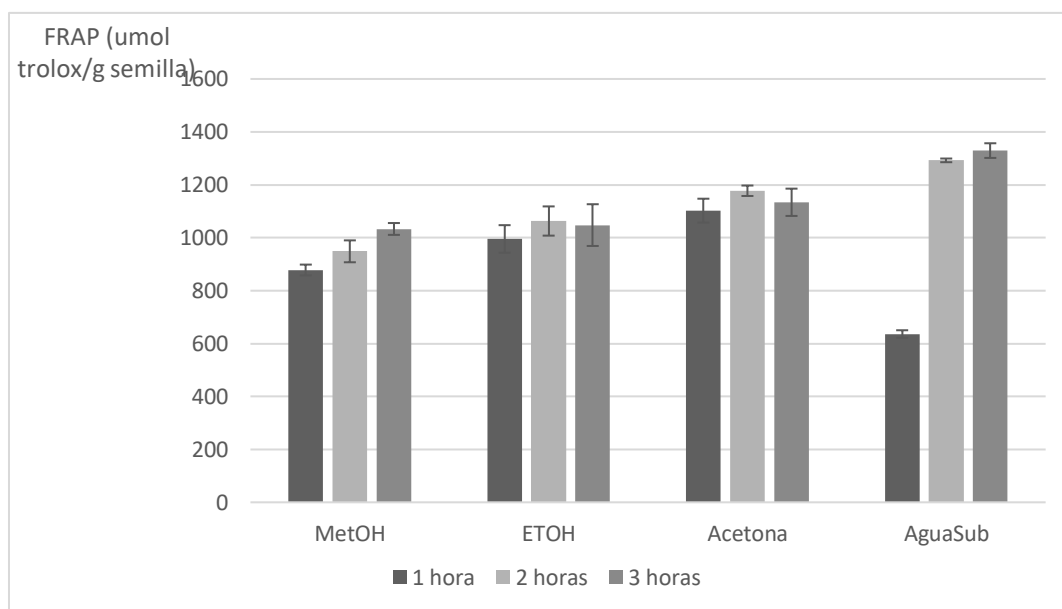
**Cuadro 20. Promedios de los valores FRAP (Poder de reducción antioxidante del hierro en  $\mu\text{mol trolox/g}$  de semilla) con la desviación estándar**

Horas	MetOH	EtOH	Acetona	AguaSub
1	878.0 <sup>c</sup> ±20.3	995.4 <sup>b</sup> ±52.1	1,102.3 <sup>a</sup> ±45.1	635.9 <sup>d</sup> ±14.3
2	948.6 <sup>d</sup> ±41.4	1,063.1 <sup>c</sup> ±55.2	1,177.4 <sup>b</sup> ±19.8	1,292.3 <sup>a</sup> ±6.9
3	1,033.1 <sup>b</sup> ±22.4	1,047.7 <sup>b</sup> ±78.9	1,133.8 <sup>b</sup> ±51.6	1,329.2 <sup>a</sup> ±27.7

Letras diferentes en cada fila indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

Letras iguales en cada fila indica que no hay diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

(Ver anexo 8). *Fuente. Elaboración propia*



**Figura 17. Capacidad antioxidante (FRAP en  $\mu\text{mol trolox/g}$  semilla) de los extractos de semilla desgrasada de uva con diferente solvente a 1, 2 y 3 h de extracción. *Fuente. Elaboración propia***

#### **4.1.9.2 Reducción del radical libre DPPH (1,1 difenil-2-picrilhidrazil).**

De igual manera que en los contenidos de CF y valores de FRAP, el tipo de solvente, el tiempo de extracción, así como la interacción de los dos factores ejercieron un efecto sobre los valores de actividad antioxidante CAET con un  $R^2=93.7\%$  (Cuadro 21), ver Anexos 10 y 11. La ecuación 7 explica el modelo factorial :

$$\begin{aligned} \text{DPPH} = & 0.9489 + 0.0144 \text{ S\_MeOH} + 0.0922 \text{ S\_EtOH} + 0.0922 \text{ S\_Acet} - 0.1989 \text{ S\_ASub} \\ & - 0.1956 \text{ T\_1} - 0.0447 \text{ T\_2} + 0.2403 \text{ T\_3} + 0.1056 \text{ S*T\_MeOH}_1 - 0.0119 \text{ S*T\_MeOH}_2 \\ & - 0.0936 \text{ S*T\_MeOH}_3 + 0.1044 \text{ S*T\_EtOH}_1 + 0.0036 \text{ S*T\_EtOH}_2 - 0.1081 \text{ S*T\_EtOH}_3 \\ & - 0.1956 \text{ S*T\_Acet}_1 - 0.0564 \text{ S*T\_Acet}_2 + 0.2519 \text{ S*T\_Acet}_3 - 0.0144 \text{ S*T\_ASub}_1 \\ & + 0.0647 \text{ S*T\_ASub}_2 - 0.0503 \text{ S*T\_ASub}_3 \dots\dots\dots (\text{Ecuación 7}) \end{aligned}$$

Los resultados son muy interesantes, en el Cuadro 22 y Figura 18 se observa valores de la capacidad antioxidante en equivalente trolox (CAET) superiores a uno, interpretándose que la actividad antioxidante de los extractos en etanol, metanol y acetona de la semilla de uva reducen mayor cantidad de radicales libres en comparación con el trolox (antioxidante sintético), los valores de CAET (mg ET/mg extracto seco) del extracto obtenido con agua subcrítica son menores en comparación con los extractos de los otros solventes (Anexo 9), no obstante, no presenta diferencia significativa con los extractos de MeOH y EtOH. El menor valor puede explicarse por la exposición del extracto a alta temperatura que puede haber contribuido a formar otro tipo de metabolitos o tal vez degradar alguno de los metabolitos, aún así, el valor de CAET del extracto de agua subcrítica a las 3 horas de extracción fue cercano a la unidad ( $0.94 \pm 0.14$ ). Los datos presentaron una distribución normal y homogeneidad de varianzas (Anexo 6).

**Cuadro 21. Análisis del diseño factorial de la CAET (mg ET/mg extracto) de los extractos en función de los Solventes y tiempo de extracción ( $R^2=93.7\%$ ) ( $\alpha=0.05$ )**

Fuente	GL	Adj SS	Adj MS	Valor F	Valor P
Modelo	11	2.1502	0.19548	15.7	0
<u>Lineal</u>	5	1.6851	0.33702	27.06	0
Solventes	3	0.51	0.16999	13.65	0
Tiempo	2	1.1751	0.58755	47.18	0
<u>Interacción</u>	6	0.4651	0.07752	6.22	0
Solventes tiempo extracción	6	0.4651	0.07752	6.22	0
Error	24	0.2989	0.01245		
Total	35	2.4491			

*Fuente. Elaboracion propia*

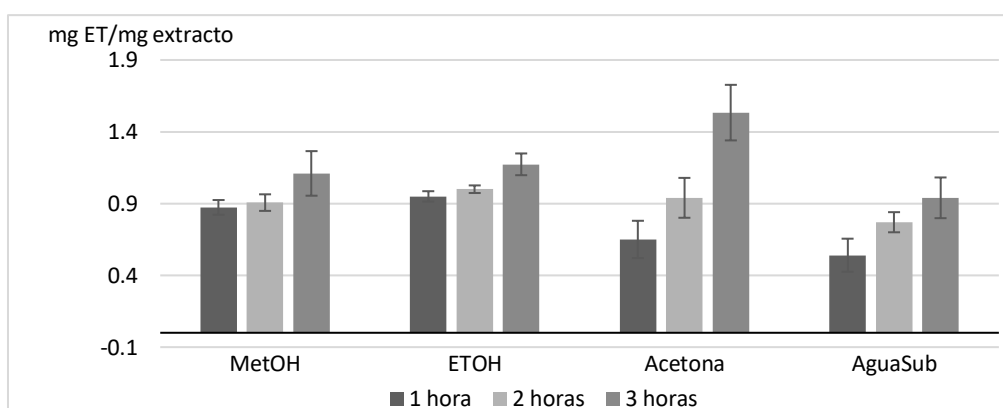
**Cuadro 22. Promedios de la CAET (mg ET/mg extracto seco) con la desviación estándar en función al tiempo de extracción**

Horas	MetOH	EtOH	Acetona	AguaSub
1	0.87 <sup>ab</sup> ±0.05	0.95 <sup>a</sup> ±0.04	0.65 <sup>bc</sup> ±0.13	0.54 <sup>c</sup> ±0.12
2	0.91 <sup>ab</sup> ±0.06	1.00 <sup>a</sup> ±0.03	0.94 <sup>ab</sup> ±0.14	0.77 <sup>b</sup> ±0.07
3	1.11 <sup>b</sup> ±0.16	1.17 <sup>ab</sup> ±0.08	1.53 <sup>a</sup> ±0.19	0.94 <sup>b</sup> ±0.14

Letras diferentes en cada fila indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

Letras iguales en cada fila indica que no hay diferencia significativa ( $p > 0.05$ )

(Ver anexo 9). *Fuente.* Elaboracion propia










**Figura 18. CAET (mg TE/mg extracto seco) de los extractos de semilla desgrasada de uva con diferente solvente a 1, 2 y 3 h de extracción. Fuente.** Elaboracion propia

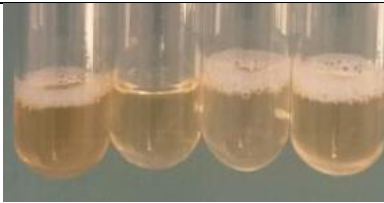



#### 4.1.10. Marcha fitoquímica

La marcha fitoquímica (Cuadro 23), prueba cualitativa, muestra los tipos de metabolitos encontrados en los extractos obtenidos con acetona, metanol, agua subcrítica y etanol. Todos los extractos presentaron una reacción evidente de fenoles, el extracto obtenido con agua subcrítica presentó alcaloides, fenoles, saponinas, aldehídos y cetonas, pero ausencia de flavonoides y taninos. Los extractos de acetona, metanol y etanol presentaron flavonoides y taninos, no presentaron alcaloides, el extracto metanol no presentó saponinas.



**Cuadro 23. Marcha fitoquímica de los extractos obtenidos con acetona, metanol, agua subcrítica y etanol.**

Ensayo	Extractos				Observación	Imagen
Alcaloides	Acetona	MetOH	AS	EtOH		
Dragendorff	-	+	+++	-	Precipitado rojo.	
Mayer	-	-	-	-	No se observó precipitado blanco.	
Bertrand	-	-	-	-	No se observó precipitado blanco.	
<b>Flavonoides</b>						
Shinoda	+	+	-	+	Coloración naranja	
<b>Fenoles</b>						
Cloruro férrico	+++	+++	++	+++	Coloración azul negro	
<b>Taninos</b>						
Gelatina	+	+++	-	++	Precipitado blanco	
Hipoclorito de sodio	+++	+	-	++	Coloración roja.	

Ensayo	Extractos				Observación	Imagen
	Acetona	MeOH	AS	EtOH		
Saponinas						
Espuma	+++	-	+++	+++	Presencia de espuma en el tubo por más de 30 min.	
Aldehídos y cetonas						
Schiff	+++	-	++	+	Coloración violeta.	
2,4 dinitrofenil hidrazina	-	-	-	-	No se observó precipitado amarillo.	
Insaturaciones						
Permanganato de potasio al 1 %	+++	+++	-	++	Precipitado marrón.	

*Fuente. Elaboracion propia*

Calificación:

- +++ : Reacción muy evidente.
- ++ : Reacción evidente.
- +: Reacción poco evidente pero aceptable.
- : No hubo reacción / reacción negativa.

#### 4.1.11. Medida de Actividad antifúngica

Los hongos representan para el hombre una fuente de pérdidas a nivel económico de muy alto nivel, además las enfermedades causadas por estos (micosis) son recurrentes en los pacientes, ya que su tratamiento es prolongado, costoso y con altos efectos secundarios. El aislamiento de moléculas de las plantas constituye una vía para disminuir el uso de aquellos fármacos de patente en los cuales estos efectos son notorios, ya que debido a la naturaleza química de los metabolitos secundarios pueden ejercer varias actividades a la vez, por ejemplo, fungicida y antioxidante (García-Hernández, Rivas-Morales y Leos-Rivas, 2016).

La prueba de difusión de agar permitió encontrar la acción fungicida de los extractos etanólico y metanólico de la semilla de uva, frente a *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Los extractos etanólico y metanólico a una concentración de 25 mg/mL y 35 mg/mL, de semillas de uva; presentaron actividad antifúngica significativa con un diámetro de halo de inhibición mayor a 18 mm (Cuadro 24), pero a la concentración de 15 mg/mL formaron un diámetro de halo de inhibición < 18 mm contra *Trichophyton mentagrophytes* (Figura 19) y *Trichophyton rubrum* (Figura 20). La actividad antifúngica puede explicarse con la marcha fitoquímica (Cuadro 23) que muestra que los extractos etanólico y metanólico contenían flavonoides y taninos García-Hernández, Rivas-Morales y Leos-Rivas, (2016), mencionan que los flavonoides y taninos presentan actividad antifúngica. No obstante, los extractos no presentaron actividad antifúngica contra *Candida albicans* (Figura 21).

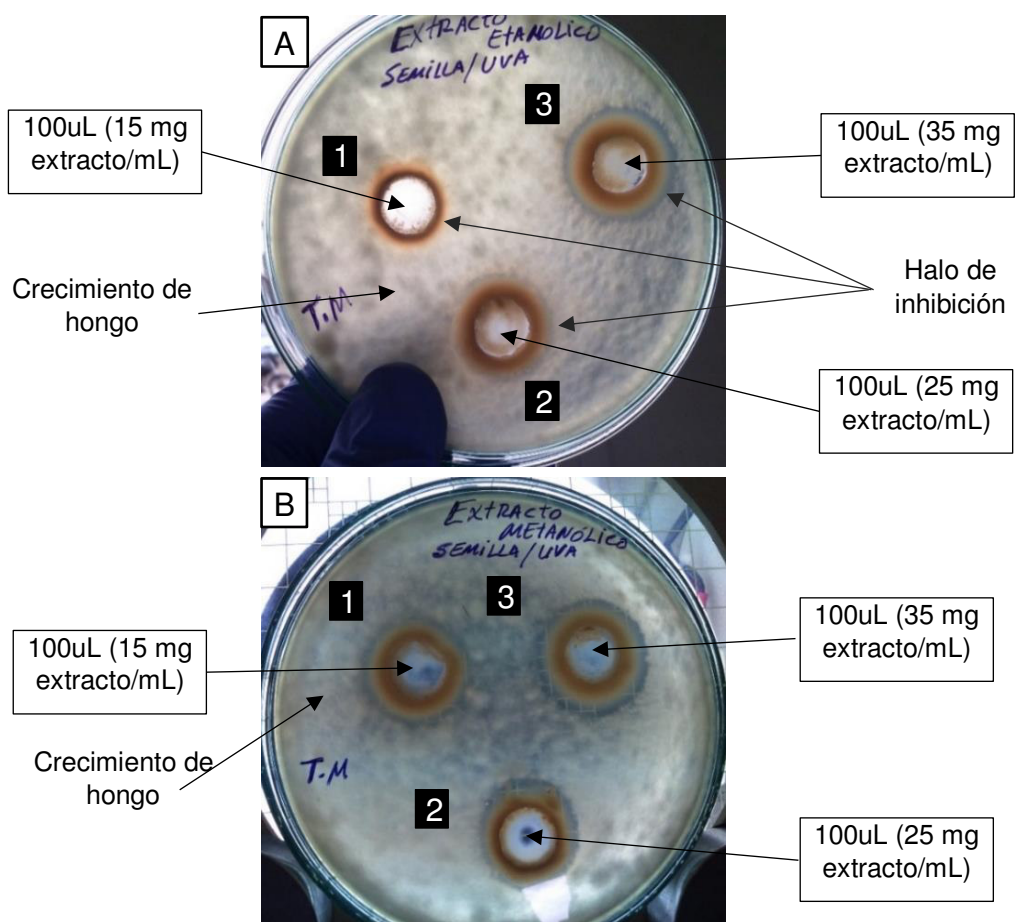
En las pruebas de Control positivo (fluconazol y dimetilsulfóxido), con la *Candida albicans* se formó un halo de inhibición (Figura 22).

Los extractos de agua subcrítica y de acetona no presentaron actividad antifúngica contra los microorganismos evaluados, la marcha fitoquímica (Cuadro 23) muestra que los extractos no contenían flavonoides y taninos a diferencia de los extractos de metanol y etanol.

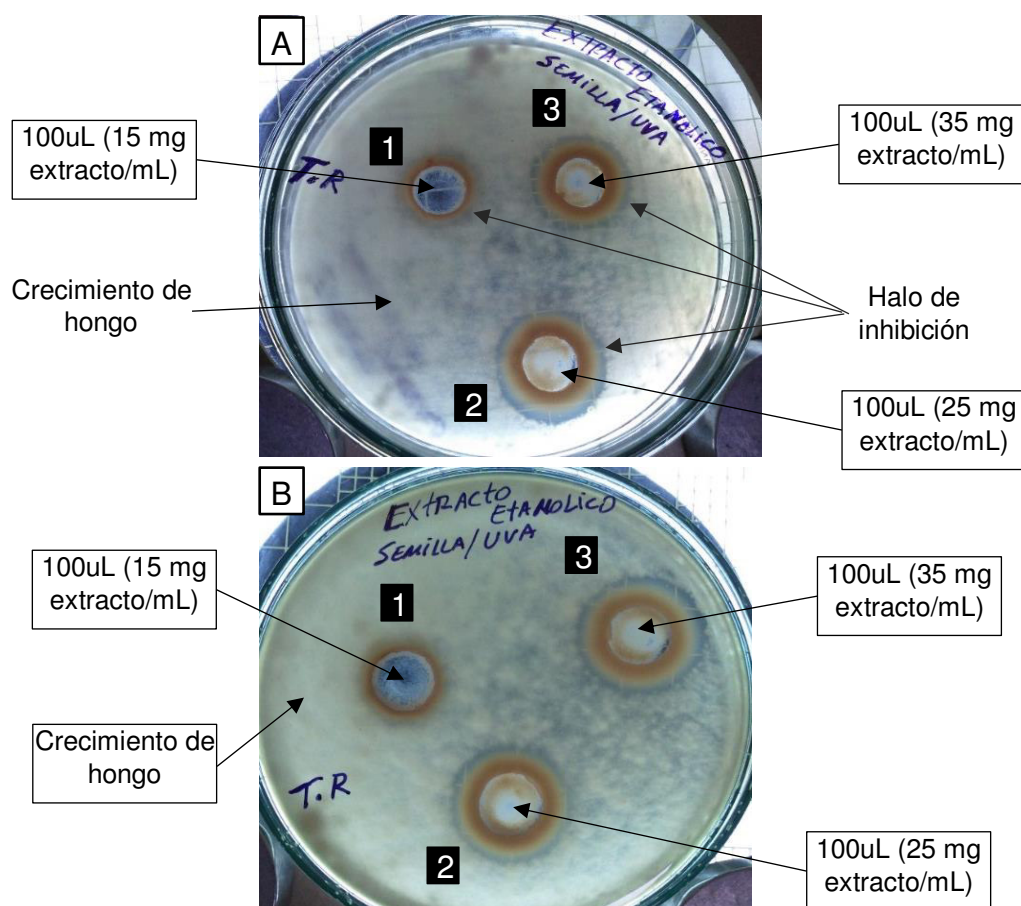
A ninguna de las concentraciones de los extractos etanólico, metanólico, acetona ni agua subcrítica de las semillas de uva variedad quebranta, residuo de la elaboración del pisco, se formaron halos de inhibición significativos (> 18 mm) contra *Candida albicans*, concluyendo que no existe actividad antifúngica contra este microorganismo (Figura 23).

En Argentina estudiaron la actividad antifúngica in vitro de extractos de 10 plantas usadas en medicina popular contra *C. albicans*, las decocciones de *G. gaudichaudianum*, *B. trimera* y *S. terebenthifolius* inhibieron el crecimiento de *C. albicans* con un valor de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 250 mg de extracto seco/ml (Davicino et al., 2007), la concentración usada fue mucho mayor que la empleada en el presente trabajo.

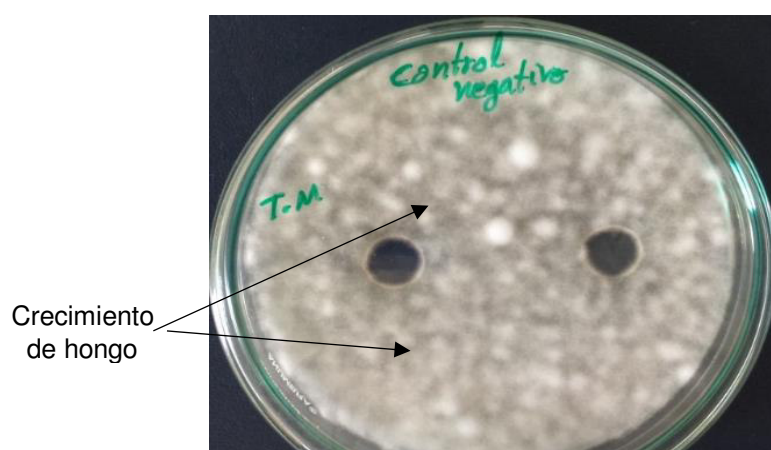
Huamani (2005) investigó la actividad antifúngica in vitro de 12 extractos etanólico correspondientes a plantas medicinales peruanas, los que presentaron actividad consistente frente a *Candida albicans* ATCC 10231 (CMI= 250 µg/mL) fueron *Hypericum laricifolium* L., *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* L. y *Schinus molle* L. (un extracto de corteza y uno de hojas) y de 500µg/mL para *Piper spp.*



**Figura 19. Actividad antifúngica, método de difusión en agar del extracto A) metanólico y B) etanólico, de semillas de uva a las concentraciones de extracto de 1: 15 mg/mL, 2: 25 mg/mL y 3: 35 mg/mL, contra *Trichophyton mentagrophytes* (Cepa procedente del INS).**

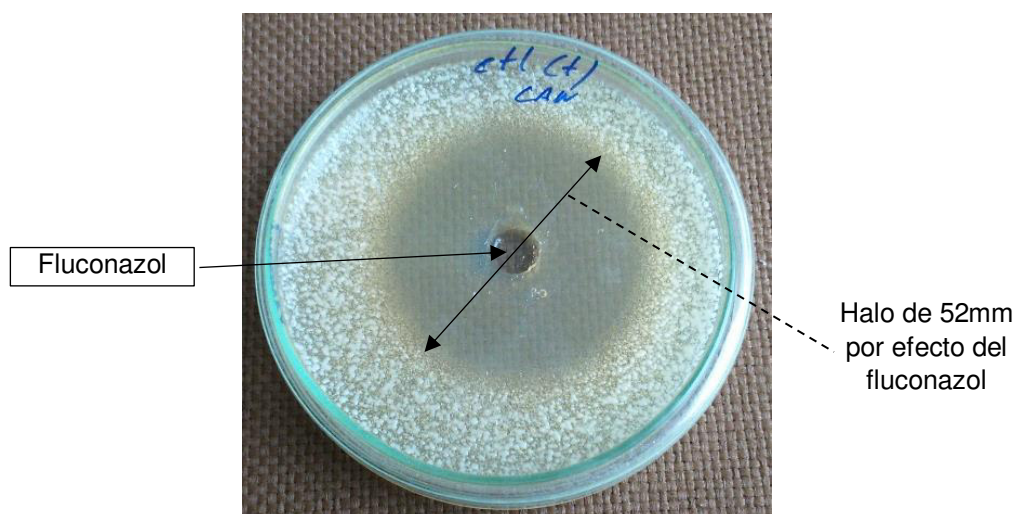


**Figura 20. Actividad antifúngica, método de difusión en agar del extracto A) metanólico y B) etanólico de semillas de uva a las concentraciones de extracto de 1: 15 mg/mL, 2: 25 mg/mL y 3: 35 mg/mL, contra *Trichophyton rubrum* (Cepas procedente del INS).**

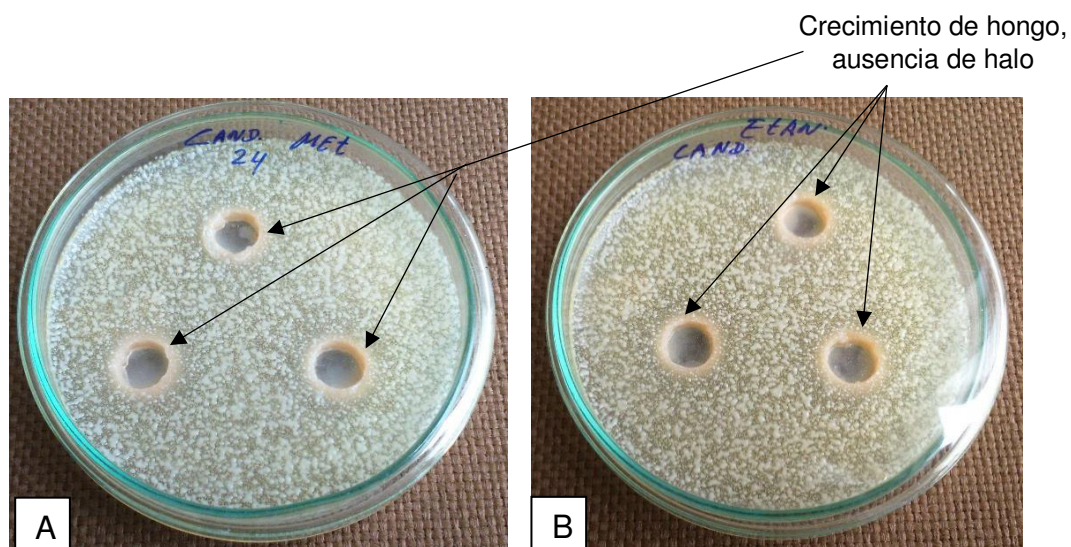


**Figura 21. Control negativo: *Trichophyton mentagrophytes* en el medio de cultivo**





**Figura 22. Control positivo: Candida Albicans, en el pozo fluconazol, con halo de inhibición de 52mm**



**Figura 23. Ausencia de Actividad antifúngica método de difusión en agar de los extractos A: metanólico y B: etanólico de semillas de uva a 1)15 mg/mL, 2) 25 mg/mL y 3)35 mg/mL, contra *Candida albicans* (Cepas procedente del INS).**

**Cuadro 24. Diámetro de los halos de inhibición (mm) por la acción de los extractos etanólico (EtOH) y metanólico (MetOH) contra *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y *Cándida albicans***

<b>Concentración de extracto</b>	<i>T.m</i> (EtOH)	<i>T. m</i> (MetOH)	<i>T. rubrum</i> (EtOH)	<i>T. rubrum</i> (MetOH)	<i>Candida</i> (EtOH)	<i>Candida</i> (MetOH)
<b>15</b>	14	16	17	17	1	0.5
<b>15</b>	15	15	15	14	0	1
<b>15</b>	14	14	17	15	0.5	0.5
<b>15</b>	17	16	18	15	0.5	0
<b>15</b>	16	16	17	15	1	1
<b>15</b>	15	15	16	16	0	0
Media	<b>15.2</b>	<b>15.3</b>	<b>16.7</b>	<b>15.3</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>
DesvEst	<b>1.2</b>	<b>0.8</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>0.4</b>	<b>0.4</b>
<b>25</b>	18	21	22	19	0	0
<b>25</b>	18	20	20	19	1	0.5
<b>25</b>	19	19	22	20	0.5	1
<b>25</b>	20	20	20	18	0	0
<b>25</b>	19	18	20	19	1	1
<b>25</b>	19	19	19	18	0.5	0.5
Media	<b>18.8</b>	<b>19.5</b>	<b>20.5</b>	<b>18.8</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>
DesvEst	<b>0.8</b>	<b>1.0</b>	<b>1.2</b>	<b>0.8</b>	<b>0.4</b>	<b>0.4</b>
<b>35</b>	22	25	24	23	1	1
<b>35</b>	23	24	25	24	0	0
<b>35</b>	21	24	25	25	0	1
<b>35</b>	22	22	24	21	1	0
<b>35</b>	23	24	22	20	0	1
<b>35</b>	22	21	22	21	2	2
Media	<b>22.2</b>	<b>23.3</b>	<b>23.7</b>	<b>22.3</b>	<b>0.7</b>	<b>0.8</b>
DesvEst	<b>0.8</b>	<b>1.5</b>	<b>1.4</b>	<b>2.0</b>	<b>0.8</b>	<b>0.8</b>

*T.m:* ***Trichophyton mentagrophytes***



## 4.2 Contrastación de hipótesis

### 4.2.1 Hipótesis específica 1

*H<sub>0</sub>*: El rendimiento (R) del aceite extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico es menor que el obtenido con hexano .  $U_{RCO_2} < U_{Rhexano}$

*H<sub>a</sub>*: El rendimiento (R) del aceite extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico es mayor que el obtenido con hexano .  $U_{RCO_2} > U_{Rhexano}$

Los valores de los rendimientos de aceite extraídos con hexano fueron 14.30; 14.6, 14.7, 14.2, 14.7 %, inferior a los rendimientos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico (16.12, 17.1, 17.2, 17.1, 17.5%), los datos cumplieron la prueba de normalidad y homogeneidad de varianza (Anexo 5).

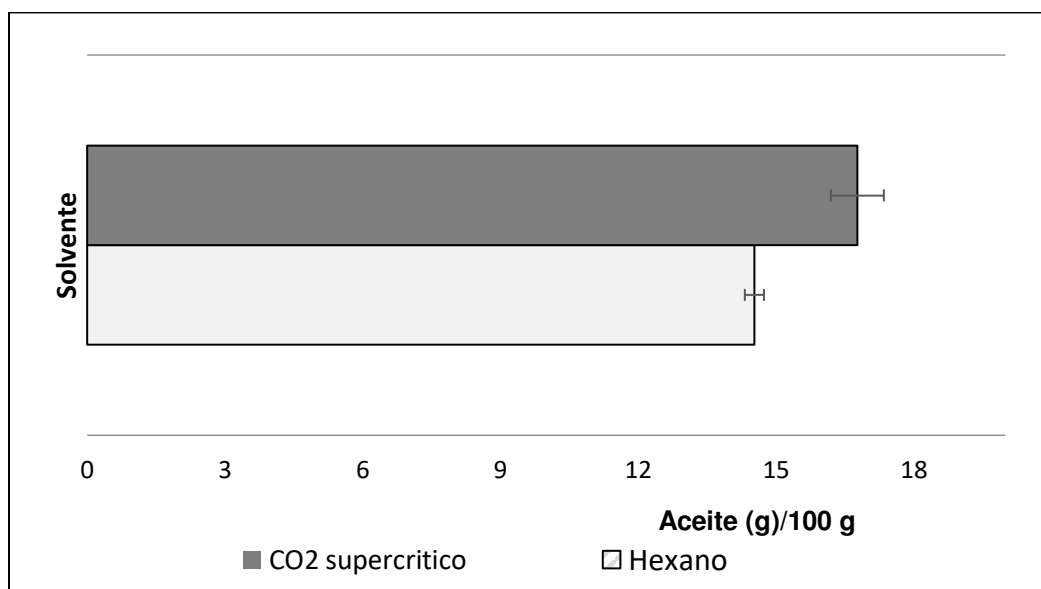
Se realizó la prueba T para muestras independientes, se realizó la comparación de los rendimientos obtenidos con CO<sub>2</sub> y Hexano (Cuadro 25).

**Cuadro 25. Estadísticos y la prueba t para muestras independientes de los rendimientos de aceite de la semilla de uva obtenidos con hexano y con CO<sub>2</sub> supercrítico**

Estadísticos de grupo					
	Tratamiento	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
extracciones	hexano	5	14.5000	0.23452	0.10488
	CO <sub>2</sub> Supercrítico	5	17.0200	0.48683	0.21772

Prueba T para la igualdad de medias					
gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
				Inferior	Superior
8	0,000	-2.520	.24166	-3.077	-1.962



**Figura 24. Rendimientos de aceite de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico (optimizado) y con hexano. Fuente. Elaboración propia**

Conclusión: Luego de comparar los promedios de los rendimientos de aceite extraídos con hexano y con CO<sub>2</sub> supercrítico, el valor  $P = 0.00$ , indicando que existe diferencia significativa entre los promedios de los rendimientos. Siendo superior el rendimiento promedio de la extracción con CO<sub>2</sub> (Cuadro 25 y Figura 24), por lo tanto, se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_a$ .

#### **4.2.2 Hipótesis específica 2**

*H<sub>0</sub>*: Los extractos de compuestos fenólicos obtenidos de la semilla de uva, con agua subcrítica, metanol, etanol o acetona tienen igual capacidad antioxidante.

*H<sub>a</sub>*: Por lo menos uno de los extractos de compuestos fenólicos obtenidos de la semilla de uva, con agua subcrítica, metanol, etanol o acetona tiene mayor actividad antioxidante que los otros extractos.

Nivel de significancia  $\alpha=0.05$

Conclusión:

a) En relación al poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP), el Cuadro 19 de análisis factorial, muestra que existe un efecto significativo del solvente y del tiempo de extracción, así como la interacción de los dos factores sobre los valores de capacidad antioxidante FRAP ( $P=0.00$ ). Además, se observa en el Cuadro 20, que a 1, 2 y 3 horas de extracción, existe diferencia significativa entre los valores FRAP de los extractos. A las 3 horas, el valor FRAP del extracto de agua subcrítica, fue superior al de los extractos de etanol, metanol y acetona. Por lo tanto, se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_a$ . Los supuestos para la aplicación de la prueba paramétrica pueden observarse en el Anexo 6.

b) De igual manera, el análisis factorial (Cuadro 21) muestra que existe un efecto significativo del solvente y del tiempo de extracción sobre los valores de capacidad antioxidante (mg ET/mg extracto) ( $P=0.00$ ). también existe un efecto combinado o interacción entre el tipo de solvente y tiempo de extracción ( $P=0.00$ ).

El Cuadro 22, muestra que a 1, 2 y 3 horas de extracción, existe diferencia significativa entre los valores de CAET. A las 3 horas de extracción, el extracto de acetona presentó mayor valor, en comparación con los otros extractos.

Por lo tanto, se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_a$ . Los supuestos para la aplicación de la prueba paramétrica pueden observarse en el Anexo 6.

#### **4.2.3 Hipótesis específica 3**

Los extractos de acetona y agua subcrítica a las concentraciones de 15, 25 y 35 mg/ml no formaron halos de inhibición contra el *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Candida albicans*.

Los extractos metanólico y etanólico a las concentraciones de 15, 25 y 35 mg/ml si formaron halos de inhibición (Figura 25). Se realizó la contrastación de hipótesis solo de los extractos que formaron halos de inhibición.

**$H_0$ :** El extracto fenólico de la semilla de uva quebranta desgrasada no presenta actividad antifúngica (formación de diámetros de halo de inhibición  $< 18$  mm), contra el *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Candida albicans*.

**$H_a$ :** El extracto fenólico de la semilla de uva quebranta desgrasada presenta actividad antifúngica (diámetros de halo de inhibición  $> 18$  mm), contra el *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Candida albicans*

Nivel de significancia  $\alpha=0.05$

Conclusión:

a) *Formación de halos de inhibición del extracto metanólico y etanólico a la concentración de 35 mg/mL*

Para el caso de *T. mentagrophytes* y *T. Rubrum*, a un  $\alpha=0.05$ ; los valores P (Cuadro 26) fueron menores que 0.05. Por lo tanto, existe evidencia estadística que los extractos etanólico y metanólico a la concentración de 35 mg/ ml forman diámetros de halos de inhibición  $> 18$  mm, se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_a$ , confirmando la actividad antifúngica contra los hongos *T. mentagrophytes* y *T. Rubrum*.

Con respecto a la *Candida albicans*, los valores P (Cuadro 26) fueron mayores que 0.05, se acepta la  $H_0$ , por lo tanto, los extractos etanólico y metanólico a la concentración 35 mg/ ml, no tienen actividad antifúngica contra la *Candida albicans*. Los supuestos pueden observarse en el Anexo 12.

**Cuadro 26. Prueba T de student, comparación de la medida de los diámetros de los halos de inhibición de los extractos (35 mg/mL) con un valor especificado ( $>18$  mm).**

Variable	N	Media	Desv Est	EEM	95% Límite superior	T	P
<i>T. mentagrophytes</i> (EtOH)	6	22.16	0.753	0.307	21.54	13.56	0
<i>T. mentagrophytes</i> (MetOH)	6	23.33	1.506	0.615	22.09	8.68	0
<i>T. rubrum</i> (EtOH)	6	23.67	1.366	0.558	22.54	10.1	0
<i>T. rubrum</i> (MetOH)	6	22.33	1.966	0.803	20.71	5.4	0.001
<i>Candida</i> (EtOH)	6	0.25	0.816	0.333	-0.005	-52	1
<i>Candida</i> (MetOH)	6	0.25	0.753	0.307	0.214	-55.8	1

EtOH: Extracto etanólico; MeOH extracto metanólico. EEM: Error estándar de la media.

*Fuente.* Elaboración propia

b) *Formación de halos de inhibición del extracto metanólico y etanólico a la concentración de 25 mg/mL*

En el Cuadro 27, a un  $\alpha=0.05$ ; los valores P fueron menores a 0.05 para el caso de *T. mentagrophytes* y *T. Rubrum*, (Cuadro 28), se rechaza la  $H_0$ , por lo tanto, existe evidencia estadística que los extractos etanólico y metanólico a la concentración de 25 mg/ ml, forman diámetros de halos de inhibición > 18 mm, confirmando una actividad antifúngica contra los hongos *T. mentagrophytes* y *T. Rubrum*.

Para el caso de la *Candida* los valores P (Cuadro 27) fueron mayores que 0.05 aceptándose la  $H_0$ , por lo tanto, los extractos etanólico y metanólico a la concentración 25 mg/ ml, no tienen actividad antifúngica contra la *Candida albicans*. Las pruebas de distribución normal y homogeneidad de varianza pueden observarse en el Anexo 12 y las fotos de las cepas empleadas se observan en el Anexo 13.

**Cuadro 27. Prueba T de student, comparación de la medida de los diámetros de los halos de inhibición de los extractos (25 mg/mL) con un valor especificado (> 18 mm).**

Variable	N	Media	Desv Est	EEM	95% Límite superior	T	P
<i>T. mentagrophytes</i> (EtOH)	6	18.83	0.753	0.307	18.214	2.71	0.021
<i>T. mentagrophytes</i> (MetOH)	6	19.5	1.049	0.428	18.637	3.5	0.009
<i>T. rubrum</i> (EtOH)	6	20.5	1.225	0.5	19.492	5	0.002
<i>T. rubrum</i> (MetOH)	6	18.83	0.753	0.307	18.214	2.71	0.021
<i>Candida</i> (EtOH)	6	0.17	0.447	0.183	0.132	-95.85	1
<i>Candida</i> (MetOH)	6	0.17	0.447	0.183	0.132	-95.85	1

EEM: Error estándar de la media.

Fuente. Elaboración propia

- c) Formación de halos de inhibición del extracto metanólico y etanólico a la concentración de 15 mg/mL.

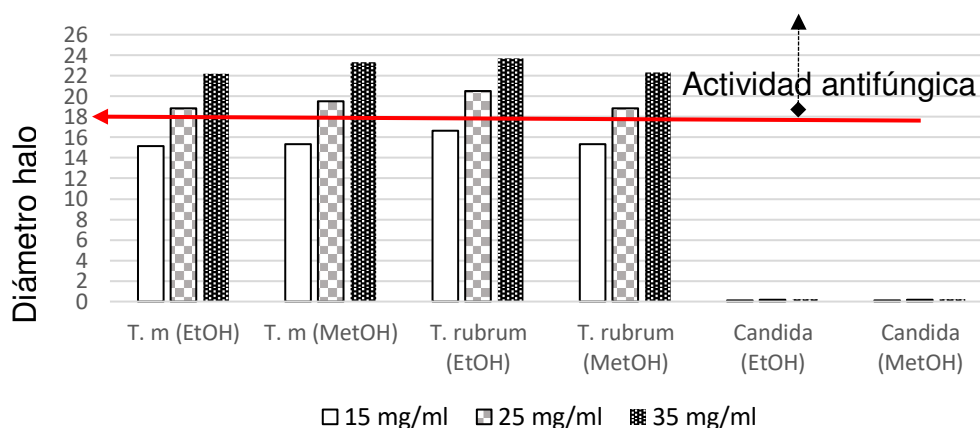
Con un  $\alpha=0.05$ , todos los valores P fueron mayores que 0.05 (Cuadro 28), por lo tanto, se rechaza la  $H_0$ , los extractos etanólico y metanólico a la concentración de 15 mg/ ml, no tienen actividad antifúngica contra el *T. mentagrophytes*, *T. Rubrum* y *Candida albicans*. (Figura 25). Las pruebas de distribución normal y homogeneidad de varianzas pueden observarse en el Anexo 12.

**Cuadro 28. Prueba T de student, comparación de la medida de los diámetros de los halos de inhibición de los extractos (15 mg/mL) con un valor especificado (> 18 mm).**

Variable	N	Media	Desv Est	EEM	95% Límite superior	T	P
<i>T. mentagrophytes</i> (EtOH)	6	15.17	1.169	0.477	14.20	-5.94	0.999
<i>T. mentagrophytes</i> (MetOH)	6	15.33	0.816	0.333	14.66	-8	1
<i>T. rubrum</i> (EtOH)	6	16.67	1.033	0.422	15.81	-3.16	0.987
<i>T. rubrum</i> (MetOH)	6	15.33	1.033	0.422	14.48	-6.32	0.999
<i>Candida</i> (EtOH)	6	0.083	0.447	0.183	0.132	-95.85	1
<i>Candida</i> (MetOH)	6	0.083	0.447	0.183	0.132	-95.85	1.0

EEM: Error estándar de la media.

Fuente. Elaboración propia



**Figura 25. Media de los diámetros de halo de inhibición de extracto etanólico (EtOH) metanólico (MeOH) a 3 concentraciones (15, 25 y 35 mg/ml) contra el *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Candida albicans*.**

Fuente. Elaboración propia

#### 4.2.4 Hipótesis general

La hipótesis general fue contrastada con la hipótesis específicas 2 y 3, concluyéndose que el extracto fenólico de la semilla de uva variedad quebranta, recuperada del residuo sólido del procesamiento de pisco presenta actividad antioxidante; y antifúngica contra el *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* . Ninguno de los extractos presentaron actividad antifúngica contra la *Cándida albicans*.

## CONCLUSIONES

- ✓ El rendimiento de la extracción de aceite obtenido con CO<sub>2</sub> supercrítico fue superior al obtenido con hexano. La optimización con el método superficie respuesta permitió lograr rendimientos con CO<sub>2</sub> supercrítico de 16.5%, llega a ser 32% superior que el rendimiento obtenido con hexano (12.5%).
- ✓ Por lo menos uno de los extractos fenólicos de la semilla de uva presentó mayor actividad antioxidante que los otros extractos. En relación al poder de reducción antioxidante del hierro, el extracto obtenido con agua subcrítica presentó el mayor valor de actividad antioxidante, llegando a 1,329.2 umol trolox/g de semilla, en comparación con los extractos de metanol, etanol y acetona que presentaron 1,033; 1,047 y 1,133 umol trolox/g respectivamente. En relación a la capacidad de reducción del radical libre DPPH, el extracto obtenido con acetona presentó mayor actividad antioxidante (1.53 mg ET/mg extracto seco) y no presentó diferencia significativa con la CAET del extracto etanólico .
- ✓ El extracto fenólico de la semilla de uva quebranta desgrasada presenta actividad antifúngica (diámetros de halo de inhibición > 18 mm), contra



el *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Los extractos metanólico y etanólico fueron los únicos extractos que presentaron la actividad antifúngica, ninguno de los extractos presentó actividad antifúngica contra *Candida albicans*.

- ✓ El valor peróxido del aceite extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico estuvo dentro de los límites exigidos por el Codex (valores menores que 15 miliequivalentes O<sub>2</sub>/ kg de aceite), pero el aceite extraído con hexano no cumplió ese requisito.

## RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar los estudios de la extracción con agua subcrítica de los compuestos fenólicos de la piel de uva del orujo, residuo de pisco y cuantificar su capacidad antioxidante.
- ✓ Desarrollar estudios de estabilidad del aceite de semilla de uva, para su posible aplicación para consumo humano.
- ✓ Promover y ampliar los estudios de la actividad antifúngica de los extractos de la semilla de uva para su uso como insumo en cremas antifúngicas.
- ✓ Cuantificar los reactivos tóxicos generados en la extracción de aceite con hexano y de compuestos fenólicos con metanol y acetona de la semilla de uva, que forma parte del orujo, residuo del proceso de elaboración de pisco.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ademiluyi, A.O., Akpambang, V.O.E. y Oboh, G. (2009). Polyphenol contents and antioxidant capacity of tropical clove bud (*Eugenia aromatic Kuntze*). *La rivista italiana Delle Sostanze Grasse*, LXXXVI.
2. Aguirre, C., Díaz Pena, A., y Agüero, G. (1978). *Vid: clasificación y caracterización botánicas*, Editorial Ciarco.
3. Aizpurua-Olaizola, O., Ormazábal, M., Vallejo, A., Olivares, M., Navarro, P., Etebarria, N., Usobiaga, A. (2015). Optimization of supercritical Fluid Consecutive Extraction of Fatty Acids and Polyphenols from Vitis Vinifera Grape Wastes. *Journal of Food Science*, 80 (1).
4. Amarowicz, R. & Weidner, S. (2009). Biological activity if grapevine phenolic compounds. En A. Kalliopi y A. Roubelakis (Eds.), *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology* (pp. 389-405). Editorial Springer.
5. Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S., Das, D., Ray, S., Kuszynski, C., Joshi, S., Pruess, H. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148, 187-197.
6. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potencial uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
7. Barba, F., Zhu, Z., Koubaa, M., Anderson, S. Orlie, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 96-100.
8. Bejar, V., Villanueva, F., Guevara, J., González, S., Vergaray, G., Abanto, E., Napán, K., Velasque, L., Vergaray, S. (2014). Epidemiología de las dermatomicosis en 30 años de estudio en el Instituto de Medicina Tropical

- Daniel A Carrión, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.  
*An. Fac med*, 75(2), 167-72.
9. Benzie, I., Strain, J., (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
  10. Bozan, B., Tosun, G., Ozcan, D. (2008). Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. *Food Chemistry*, 109, 426–430.
  11. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT- Food Science and Technology*, 28, 25-30.
  12. Bustamante, M, Moral, R., Paredes, A., Pérez-Espinoza, Moreno-Caselles, Perez-Murcia, M. (2008). Agrochemical characterization of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management*, 28, 372-380.
  13. Cano C, Bonilla P, Roque M. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Mintostachys mollis* (muña). *Rev. Perú med. Exp. Salud pública*, 25(3), 298-301: Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v25n3/a08v25n3.pdf>.
  14. CODEX. (2015). *Norma para aceites vegetales especificados Codex stan 210-1999*. Recuperado de [www.fao.org/input/download/standards/336/CXS\\_210s\\_2015.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/336/CXS_210s_2015.pdf).
  15. CODEX. (2017). *Report of the 25th Session of the Codex Committee on Fats and Oils* Pp. 55.
  16. Cornejo, F. (2012). Recuperación de compuestos fenólicos de bagazo de uva roja (*Vitis vinífera*) por microondas y métodos convencionales. *Maestría en Nutrición humana*. Facultad de ciencias naturales. De la universidad autónoma de Querétaro. México D.F
  17. Cunico, L.P. and Turner, C. (2017). Supercritical Fluids and Gas-Expanded Liquids. En F. Pena-Pereira y M. Tobiszewski (Eds.), *The Application of Green Solvents in Separation Processes* (pp. 155-214). United States: Elsevier.

18. da Silva, R., Rocha-Santos, T., Duarte, A. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry* 76: 40-51.
19. Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in Biotechnology* , 23:174-181. On line at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
20. Davicino, R., Mattar, M. A., Casali, Y. A., Correa, S. G., Pettenati, E. M., Micaalizzi, B. (2007). Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Rev. Perú. biol.* 14(2): 247-251.
21. Del Valle, J., De la Fuente J. (2006). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oilseeds: review of kinetic and equilibrium models, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46 : 131-160.
22. Díaz, M., Madejon, E., López, F., Lopez, R., Cabrera, F.(2002). Optimization of the rate vinasse/grape marc for co-composting process. *Process Biochemistry* 37: 1143-1150.
23. Duba, K. S., Casazzab, A.A., Mohamed, H.B., Perego, P., y Fiori, L. (2015). Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: Experiments and modeling. *Food and Bioproducts processing* 94:29–38
24. Duba, K. S., Fiori, L. (2015). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction kinetics. *J. of Supercritical Fluids* 98 (2015) 33–43.
25. Duval, G. 2007. Enrique Leff, Aventuras de la epistemología ambiental. De la articulación de las ciencias al diálogo de saberes, Siglo XXI Editores, México, 2006, 138 p, Polis [URL : <http://polis.revues.org/4786>], 16 | 2007, consulte el 15 agosto 2017.
26. Eyiler, E., Burcin, E., Vural, H. (2011). Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis Vinífera*) using supercritical carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids* 55 (2011) 924-928.
27. Fernandes, L., Casal, S., Cruz, R., Pereira, J., Ramalhosa, E. (2013). Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International* 50 : 161–166
28. Ferry, M., Bin, S., Vallini, V., Fava, F., Michellini, E., Roda, A. Minnuci G., Buchi, G., & Tassoni, A. (2015). Recovery of polyphenols from red grape

- pomace and assessment of their antioxidant and anti-cholesterol activities. *New Biotechnology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2015.12.004>.
29. Fiori, (2007). Grape seed oil supercritical extraction kinetic and solubility data: Critical approach and modeling. *J. of Supercritical Fluids* 43 (2007) 43–54.
  30. Gallón, J. (2015). Cambios morfológicos e inhibición del crecimiento de *Candida albicans* en presencia de una solución de sulfato de zinc. *NOVA*. 2015; 13 (23): 7-15.
  31. Garcia-Becerra, L., Montserrat, M., Rivas-Morales, C., Verde-Star, J., Oranday-Cardenas, A., Vinardell, M. (2016) Antioxidant comparative effects of two grape pomace Mexican extracts from vineyards on erythrocytes. *Food Chemistry* 194 (2016) 1081–1088
  32. García-Hernández, D.G., Rivas-Morales, C., & Leos-Rivas, C. (2016). Actividad antifúngica. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde- Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: Omnia Science. 101-128.
  33. Goodship, V. & Ogar, E. (2004). Rapra review reports. *Polymer Processing. Supercritical Fluids*. Vol. 15, Number 8. 135 pp.
  34. Grupo Banco Mundial. Guías sobre Medio Ambiente, Salud y Seguridad para la Producción y Procesamiento de Aceite Vegetal (12 de febrero 2015). Recuperado de [https://www.ifc.org/wps/wcm/connect/45b741004ade88459ce3fe4fb4720a61/Spanish\\_Veg+Oil\\_Feb+2015\\_FINAL.pdf?MOD=AJPERES](https://www.ifc.org/wps/wcm/connect/45b741004ade88459ce3fe4fb4720a61/Spanish_Veg+Oil_Feb+2015_FINAL.pdf?MOD=AJPERES)
  35. Huamani, M. y Ruiz, J. (2005). Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales en 3 departamentos del Perú. *Tesis para optar el título profesional de químico farmacéutico*. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNFV.
  36. Indecopi (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual). (2006). Bebidas Alcohólicas. Pisco. Requisitos. Norma Técnica Peruana. NTP 211.001.
  37. Indecopi (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual) NTP 209.217:1983 (revisada

- 2018). Aceites y Grasas Comestibles. Método de determinación del índice de anisidina.
38. INEI. (Instituto Nacional de Estadística). (2017). Producción de uva y pisco, estadísticas. <http://webapp.inei.gob.pe:8080/sirtod-series/> visto 9.05.18
  39. Karvela E. Makris, D.P., Kalogeropoulos, N., Karathanos, V.T., Kefalas, P. (2009). Factorial design optimisation of grape (*Vitis vinifera*) seed polyphenol extraction. *Eur Food Res Technol* (2009) 229:731–742
  40. Leff Enrique. 2006. complejidad, racionalidad ambiental y diálogo de saberes. ponencia del congreso internacional interdisciplinar de participación, animación e intervención socioeducativa, celebrado en Barcelona en noviembre de 2005. [URL: [http://www.mapama.gob.es/es/ceneam/articulos-de-opinion/2006\\_01eleff\\_tcm7-53048.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/ceneam/articulos-de-opinion/2006_01eleff_tcm7-53048.pdf)] consultado en diciembre 2017
  41. Lock, O. (2016) Investigación fitoquímica. Pontificia Universidad Católica del Perú. Departamento de Ciencias. Primera edición
  42. López, C. y Aguillón J. (2015). Evaluación in-vitro de la actividad antifúngica del extracto de *Bocconia frutescens* L. Frente al hongo *Trichophyton mentagrophytes*.
  43. Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D., Reinhold, C. (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 112 (2009) 551- 559.
  44. Martínez, J. and Vance, S. (2007). Supercritical Extraction Plants Equipment, Process, and costs. *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*. Edited by Jose Martinez. Pp 25-49.
  45. Mesa, A., Bueno, J. y Betancur, L. (2004). Productos Naturales con actividad antimicótica. *Rev. Esp. Quimioterap*; Vol 17 (Nº4): 325-331. Sociedad Española de Quimioterapia.
  46. Mieres, A., Andrade, A., García, L., Londoño, L. (2012). Extracción del aceite de la semilla de uva variedad “Criolla negra” y su caracterización. *Anales de la Universidad Metropolitana*. Vol. 12, Nº 1, 2012: 193-206. Carabobo. Venezuela.

47. Montgomery, D. (2002). Diseño y análisis de experimentos. Arizona. Limusa Willey. 692 pp
48. Muñoz, S. (2007). Los métodos cuantitativo y cualitativo en la evaluación de impactos en proyectos de inversión social. Tesis para optar el grado académico de Doctor en ciencias de la Investigación. Universidad Mariano Gálvez de Guatemala. 89 PP.
49. Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G., Kakuda, Y. (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 48:176-181
50. Nowshehri, J., Zulfiqar, A. y Mohammad, Y. (2015). Blessings in disguise: Bio-functional benefits of grape seed extracts. *Food Research International* Vol 77.( Part 3): 333-348
51. Organización de las Naciones unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) y la Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT). (2012). Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos 91. Granada, España. 2012.
52. Organización de las Naciones unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) (1986). Análisis de alimentos pp
53. Özcan, M., Ünver, A., Gümüş, T. & Akın, A. (2012): Characteristics of grape seed and oil from nine Turkish cultivars, *Natural Product Research*:26:21, 2024-2029
54. Paladino, S. & Zuritz, C. (2012). Extracto de semillas de vid (*Vitis vinifera* L.) con actividad antioxidante: concentración, deshidratación y comparación con antioxidantes de uso comercial. *Rev. FCA UNCUIYO*. 2012. 44(2): 131-143.
55. Passos, C., Silva, R., Da Silva, F., Coimbra M., Silva, C. (2010). Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity. *Chemical Engineering Journal* 160 (2010) 634–640
56. Peace Software—[http://www.peacesoftware.de/einigewerte/co2\\_e.html](http://www.peacesoftware.de/einigewerte/co2_e.html) (accesed November, 2015).
57. Pérez, A., Chamorro, L., y Vitola, D. (2017). Caracterización química y evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial foliar de *Lippia alba*

- contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Revista peruana de biología 24(2): 211 – 216.
58. Prado, J., Dalmolin, I., Carareto, N., Basso, R., Meirelles, A., Oliveira, J., Batista, E., M. Angela A. Meireles (2012). Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. Journal of Food Engineering 109) 249–257.
  59. Prevot y Mordret. (1976). Revue Francaise des Corps Gras, 23 anne, N° 7-8.
  60. Programa de las Naciones Unidas. PNUD (2004). La uva y el pisco. Potencialidades productivas. 20. Recuperado de [http://cendoc.esan.edu.pe/fulltext/e-documents/PNUD/Pub\\_UvaPisco.pdf](http://cendoc.esan.edu.pe/fulltext/e-documents/PNUD/Pub_UvaPisco.pdf)
  61. Raventós, M., Duarte, S., Alarcón, R. (2002). Application and Possibilities o Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction in Food Processing Industry: An Overview. Food Sci Tech Int
  62. Restrepo, M. (2006). Producción más limpia en la Industria alimentaria. Producción + limpia - Enero-Junio 2006. Vol I N° 1.
  63. Rodríguez, H., Mendoza, M., Correa, D. y Casares, E. (2015). Evaluación morfológica y bioquímica de aislados clínicos de *Trichophyton spp*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2015; 35:33-39.
  64. Rojas, R., Bustamante, B., Bauer, J., Fernández, I., Alban, J., Lock, O. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 88 (2003) 199-204.
  65. Rouquié, C., Dahdouh, L., Delalonde, M., Wisniewaki, C. (2017). An innovative lab-scale strategy for the evaluation of Grape Processing Residues (GPR) filterability: Application to GPR valorization by ultrafiltration. Innovate Food Science and Emerging Technologies.
  66. Ruiz, J. (2013). Actividad Antifúngica In Vitro y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Microdilución de ocho plantas medicinales. Tesis para optar el grado académico de magister en microbiología. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica
  67. Sandoval, M., Lazarte K., Arnao, I. Hepatoprotección antioxidante de la cáscara y semilla de *Vitis vinifera* L. (uva). (2008). An. Fac. Med; 69(4):250-9.



68. Shahidi, F. and Zhong, Y. (2005). Lipid Oxidation: Measurement. Chapter July. Methods. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Sixth Edition. Six Volume Set. Edited by Fereidoon Shaidi. DOI: 10.1002/047167849X.bio050.
69. Shahidi, F. and Zhong, Y. (2007). Measurement of antioxidant Activity in Food and Biological Systems. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2007 Department of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland A1B 3X9, Canada.
70. Singleton, V., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of Total Phenols and other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. 152-178
71. Snedecor, G. y Cochran, W. 1982. Metodos estadísticos. Editorial Continental S.A. Mexico D.F. 703 pp
72. Turner, Ch. y Ibañez, E. (2012). Pressurized hot water extraction and processing. En N. Lebovka, E. Vorobiev y F. Chemat (Eds.), Enhancing Extraction Processes in the Food Industry (pp. 223-254). CRC Press.
73. Uematsu, M., Frank, E. (1980). Tatic dielectric. Constant of Water and Steam. J. Phys. Chem. Ref. Data, 9 (4), 1291-1306.
74. Velasco, R., Villada, H., Carrera, J. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. Información Tecnológica Vol. 18(1), 53-65. <http://www.scielo.cl/pdf/infotec/v18n1/art09.pdf>.
75. Wen, X., Yuan-Ying, N., Li, J. (2016). Characterization of seed oils from different grape cultivars grown in China. J Food Sci Technol (July 2016) 53(7):3129–3136
76. Xia, E., He, X., Li, H., Wu, S., Li, S., Guifang, D. (2014). Chapter 5. Biological Activities of Polyphenols from grapes. Polyphenols in Human Health and disease. Vol 1: Polyphenols in Chronic Disease and their Mechanisms of Action. Section 1. Overview of Polyphenols and Health. Edited by Ronald Ross Watson, Victor R. Preedy and Sherma Zibadi.

**ANEXO 1. Prueba de normalidad, de homogeneidad de varianzas y prueba T de los rendimientos de aceite en función al tamaño de partícula de la semilla de uva (P=0.01)**

Prueba de normalidad de Shapiro Wilk

Tamaño (mm)		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
R (%)	0.71mm	0,975	3	0,698
	1.2mm	0,939	3	0,525

*Fuente:* Elaboracion propia

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,094	1	4	0,355

*Fuente:* Elaboracion propia

Prueba T de los rendimientos de aceite de dos tamaños de partícula de semilla de uva

	Diferencias relacionadas						Sig. (bilatera l)	
	Desviación		Error típ. de la media	99% Intervalo de confianza para la diferencia		t		
	Media	típ.		Inferior	Superior			gl
R -	5.56	.43589	.25166	3.06230	8.05770	22,093	2	.002

*Fuente:* Elaboracion propia

**ANEXO 2. Prueba de distribución normal y de homogeneidad de varianza de los datos de rendimiento, POV y Anisidina del aceite de semilla de uva (P=0.01)**

Codificación de las variables independientes para la evaluación de la distribución normal

Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo (g/min)	Códigos para el análisis estadístico		
			Presión	Temperatura	Flujo
170	40	30	1	1	1
250	40	30	2	1	1
170	60	30	1	2	1
250	60	30	2	2	1
170	40	50	1	1	2
250	40	50	2	1	2
170	60	50	1	2	2
250	60	50	2	2	2
142.7	50	40	3	3	3
277.3	50	40	4	3	3
210	33.2	40	5	4	3
210	66.8	40	5	5	3
210	50	23.2	5	3	4
210	50	56.8	5	3	5
210	50	40	5	3	3
210	50	40	5	3	3
210	50	40	5	3	3

*Fuente:* Elaboracion propia

Prueba de normalidad Shapiro –Wilk en función de cada variable independiente

	Temperatura				Flujo			Presión			
	Código	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	Código	Estadístico	gl	Sig.
R	1.00	.739	4	.030	.903	4	.444	1.00	.921	4	0.542
	2.00	.839	4	.192	.802	4	.106	2.00	.984	4	0.927
	3.00	.872	7	.192	.868	7	.178	5.00	.831	7	0.081
POV	1.00	.925	4	.565	.935	4	.626	1.00	.856	4	0.248
	2.00	.993	4	.970	.994	4	.975	2.00	.947	4	0.698
	3.00	.967	7	.875	.855	7	.135	5.00	.875	7	0.204
Anisidina	1.00	.893	4	.397	.957	4	.763	1.00	.813	4	0.127
	2.00	.732	4	.026	.860	4	.260	2.00	.784	4	0.076
	3.00	.820	7	.065	.903	7	.346	5.00	.840	7	0.099

*Fuente:* Elaboracion propia

Prueba de homogeneidad de varianzas considerando  
variable independiente : Presión

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
R	2.584	2	12	.117
Ansidina	.426	2	12	.663
POV	1.475	2	12	.267

*Fuente:* Elaboracion propia

Prueba de homogeneidad de varianzas considerando  
variable independiente: Temperatura

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
R	1.383	2	12	.288
Ansidina	1.883	2	12	.194
POV	.057	2	12	.945

*Fuente:* Elaboracion propia

Prueba de homogeneidad de varianzas considerando  
variable independiente: Flujo

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
R	.471	2	12	.636
Ansidina	.046	2	12	.955
POV	1.912	2	12	.190

*Fuente:* Elaboracion propia

**ANEXO 3. ANOVA del diseño Superficie Respuesta del valor peróxido VS  
Presión, temperatura y Flujo (P= 0.01)**

Fuente	GL	Suma Cuadr	Suma Media	Valor F	Valor P
Modelo	9	5.07575	0.56397	1.33	0.363
Lineal	3	0.40186	0.13395	0.31	0.815
P	1	0.00474	0.00474	0.01	0.919
T	1	0.01114	0.01114	0.03	0.876
F	1	0.38598	0.38598	0.91	0.373
Cuadrático	3	3.71295	1.23765	2.91	0.111
P*P	1	2.91899	2.91899	6.86	0.034
T*T	1	0.08861	0.08861	0.21	0.662
F*F	1	0.3583	0.3583	0.84	0.389
Interacción	3	0.96094	0.32031	0.75	0.555
P*T	1	0.40051	0.40051	0.94	0.364
P*F	1	0.42781	0.42781	1.01	0.349
T*F	1	0.13261	0.13261	0.31	0.594
Error	7	2.97903	0.42558		
Lack-of-Fit	5	2.46596	0.49319	1.92	0.377
Pure Error	2	0.51307	0.25653		
Total	16	8.05478			

$R^2 = 63.02\%$

*Fuente:* Elaboracion propia

**ANEXO 4. ANOVA del diseño Superficie Respuesta de anisidina VS Presión, temperatura y Flujo (P=0.01)**

Fuente	GL	Suma Cuadr	Suma Media	Valor F	Valor P
Modelo	9	10.415	1.15722	2.87	0.09
Lineal	3	4.0072	1.33575	3.31	0.087
P	1	1.914	1.91405	4.74	0.066
T	1	0.0914	0.0914	0.23	0.649
F	1	2.0018	2.00179	4.96	0.061
Cuadrático	3	5.8229	1.94095	4.81	0.04
P*P	1	4.102	4.102	10.16	0.015
T*T	1	2.2949	2.2949	5.68	0.049
F*F	1	2.6881	2.68808	6.66	0.036
Interacción	3	0.5849	0.19497	0.48	0.705
P*T	1	0.5832	0.5832	1.44	0.269
P*F	1	0.0012	0.00125	0	0.957
T*F	1	0.0004	0.00045	0	0.974
Error	7	2.8268	0.40383		
Lack-of-Fit	5	2.8154	0.56308	98.79	0.012
Pure Error	2	0.0114	0.0057		
Total	16	13.2418			

$R^2 = 78.65\%$

*Fuente:* Elaboracion propia

**ANEXO 5. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza de los rendimientos de aceite de semilla de uva extraídos con CO<sub>2</sub> supercrítico y hexano. (P=0.01)**

➤ Prueba de normalidad:

Ho: Los rendimientos de aceite de la semilla presentan distribución normal

Ha: Los rendimientos de aceite de la semilla no presentan distribución normal.

**Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (P=99%)**

	Solvente de extracción	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Rendimiento	CO <sub>2</sub>	.864	5	0.243
	Hexano	.836	5	0.154

*Fuente:* Elaboracion propia

Conclusión: Se acepta la Ho, los rendimientos de aceite de la semilla de uva tienen distribución normal.

➤ Prueba de homogeneidad de varianza:

Ho: Los rendimientos de aceite presentan homogeneidad de varianza

Ha: Los rendimientos de aceite no presentan homogeneidad de varianza

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

Rendimiento de aceite

Estadístico de				
	Levene	gl1	gl2	Sig.
	0.869	1	8	0.379

*Fuente:* Elaboracion propia

Conclusión: Se acepta la Ho, los rendimientos de aceite de la semilla de uva tienen homogeneidad de varianza.

**ANEXO 6. Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y grafico de residuos de CF, FRAP y DPPH de los extractos etanólico, metanólico, acetona y agua subcrítica (P=0.01)**

➤ Prueba de normalidad:

Ho: Los valores de CF, FRAP y DPPH de los extractos de la semilla presentan distribución normal

Ha: Los valores de CF, FRAP y DPPH de los extractos de la semilla no presentan distribución normal.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Cf	0.934	36	0.034
FRAP	0.947	36	0.086
DPPH	0.947	36	0.085

*Fuente:* Elaboracion propia

Conclusión: Se acepta la Ho, los valores de CF, FRAP y DPPH de los extractos de la semilla tienen distribución normal

➤ Prueba de homogeneidad de varianza:

Ho: Los valores de CF, FRAP y DPPH de los extractos de la semilla presentan homogeneidad de varianza

Ha: Los valores de CF, FRAP y DPPH de los extractos de la semilla no presentan homogeneidad de varianza

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

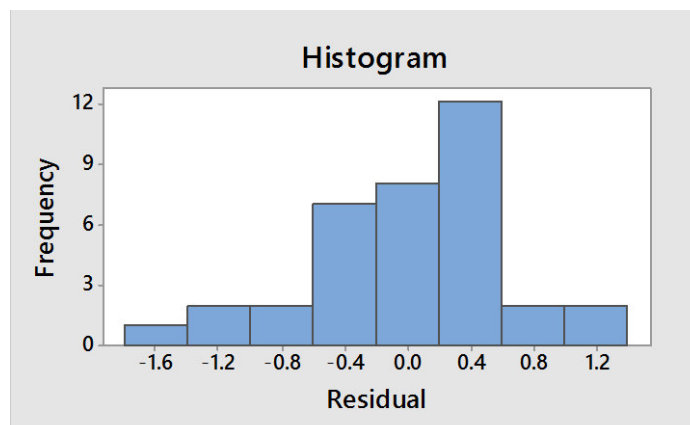
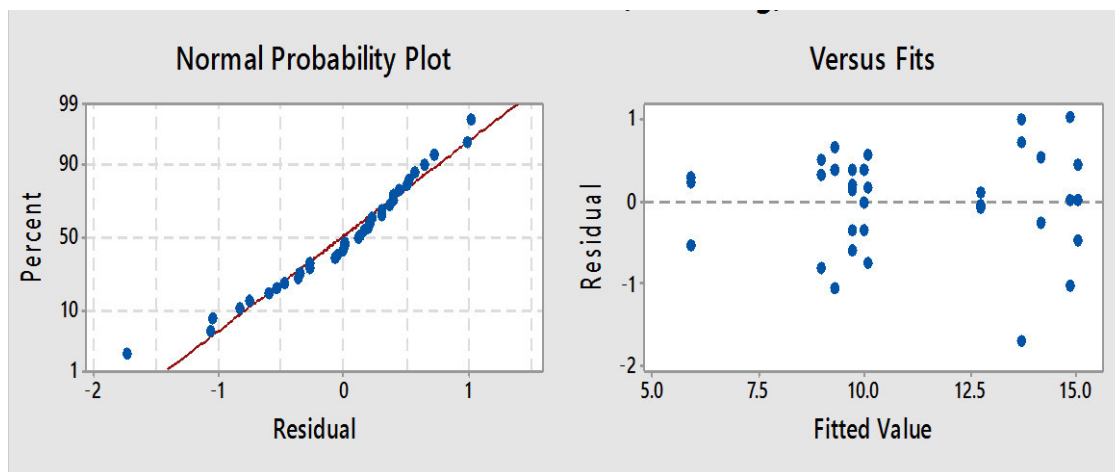
Tiempo de extracción	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
CF EAG	0.660	2	33	0.524
FRAP	0.796	2	33	0.460
DPPH	3.080	2	33	0.059

*Fuente:* Elaboracion propia

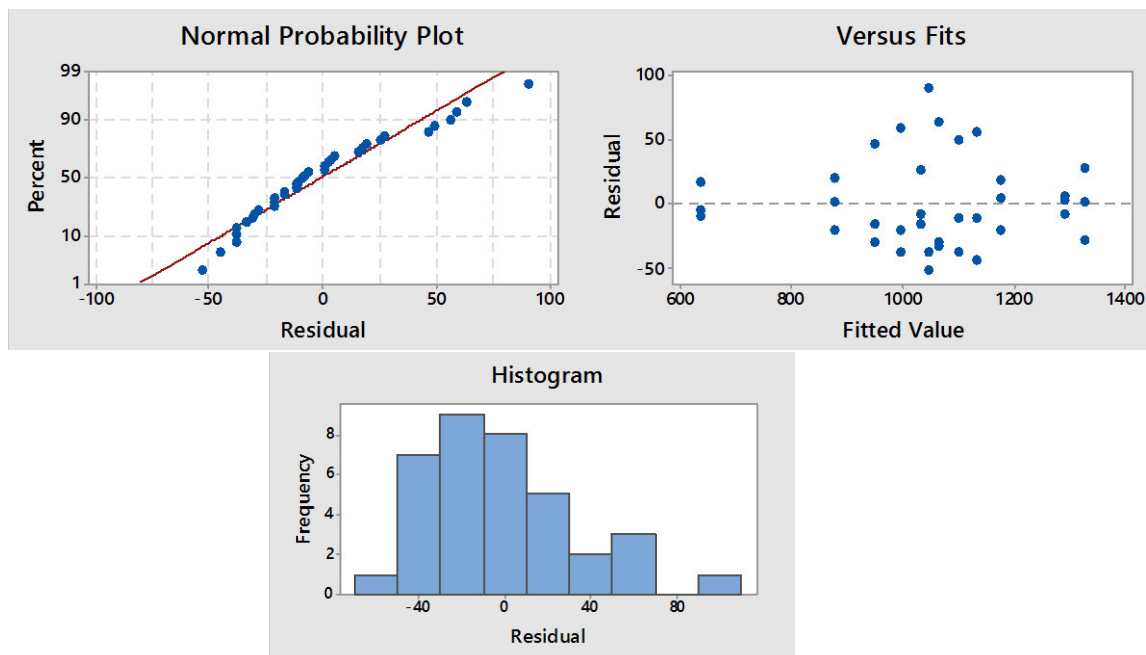


Conclusión: Se acepta la  $H_0$ , los valores de CF, FRAP y DPPH de los extractos de la semilla presentan homogeneidad de varianza

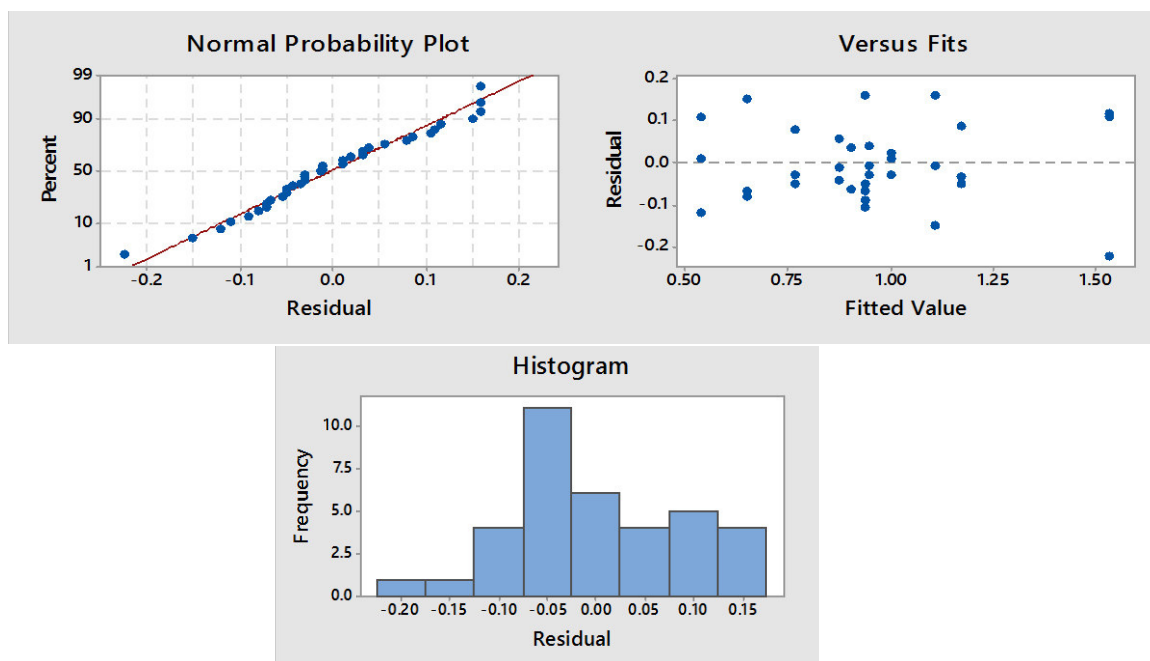
- Grafica de los residuos de los valores de compuestos fenólicos



- Gráfico de los residuos de los valores de FRAP (umol trolox/gramo de semilla)



- Gráfica de los residuos de los valores de capacidad antioxidante (mg ET/mg extracto seco)

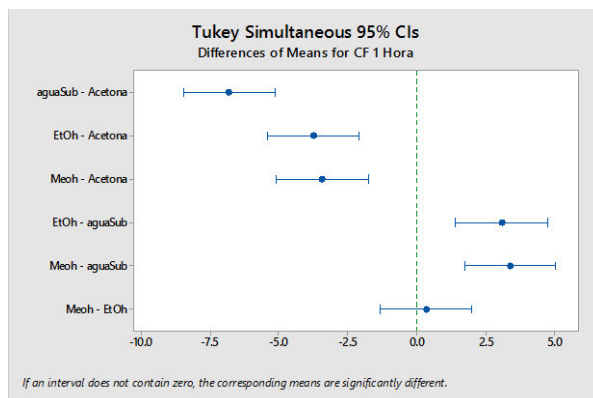


Conclusión: En la gráfica de probabilidad normal los residuos siguen la línea recta. En la gráfica de los residuos con ajustes los puntos están distribuidos aleatoriamente a ambos lados de cero y en el histograma se observa que la distribución es asimétrica. Por lo tanto, el modelo se ajusta a los datos.

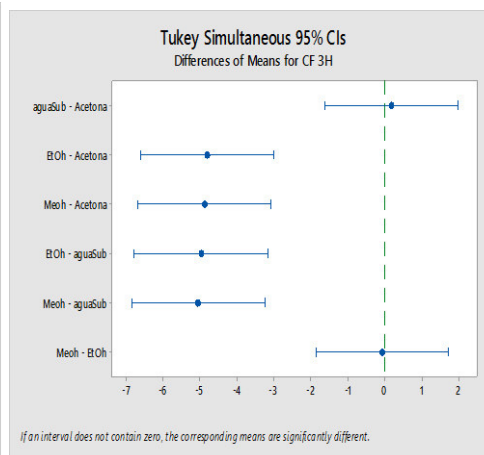
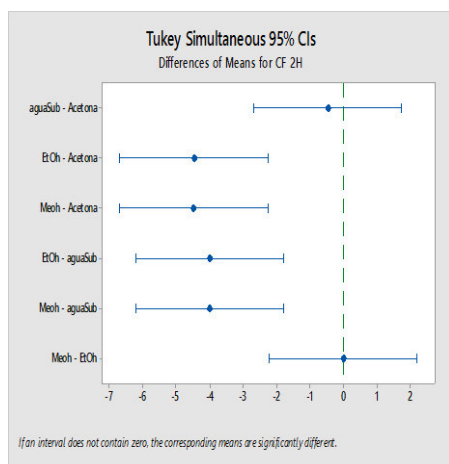
**Anexo 7. ANOVA y Prueba de comparaciones (Tukey) de los valores de CF (EAG/100 g de semilla) a 1, 2 y 3 horas de extracción**

**ANOVA**

1 hora						2 Horas					
Fuente	GL	SC	CM	Valor F	Valor P	Fuente	GL	SC	CM	Valor F	Valor P
Tratamiento	3	69.901	23.3002	57.65	0	Tratamiento	3	54.217	18.0724	25.37	0
Error	8	3.234	0.4042			Error	8	5.699	0.7123		
Total	11	73.134				Total	11	59.916			
			3 Horas								
			Fuente	GL	SC	CM	Valor F	Valor P			
			Tratamie	3	73.014	24.3382	51.62	0			
			Error	8	3.772	0.4715					
			Total	11	76.786						



*Fuente:* Elaboracion propia



*Fuente:* Elaboracion propia

**Anexo 8. Anova y prueba de comparaciones (Tukey) de los valores de FRAP (umol trolox/ g de semilla) a 1, 2 y 3 horas de extracción.**

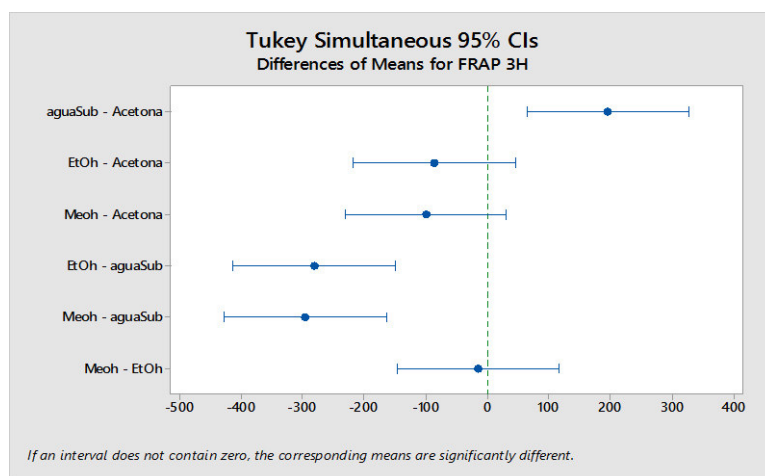
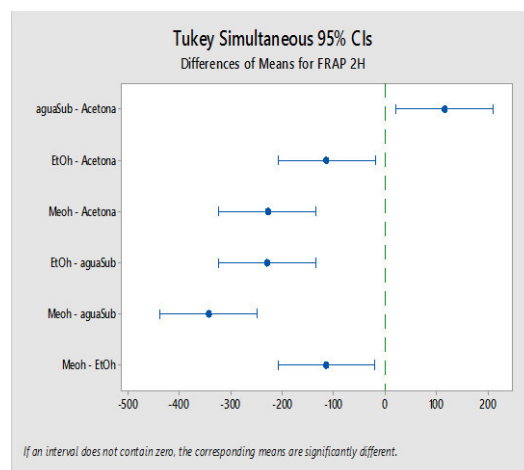
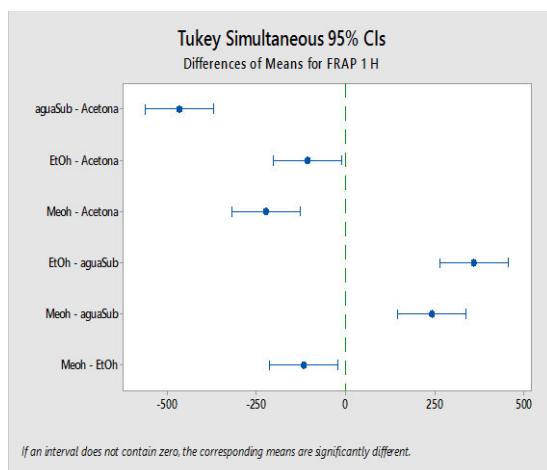
**ANOVA**

1 Hora						2 Horas					
Fuente	GL	SC	CM	Valor F	Valor P	Fuente	GL	SC	CM	Valor F	Valor P
Tratamiento	3	69.901	23.3002	57.65	0	Tratamiento	3	69.901	23.3002	57.65	0
Error	8	10722	1340			Error	8	10399	1300		
Total	11	371237				Total	11	207241			
			3 Horas								
			Fuente	GL	SC	CM	Valor F	Valor P			
			Tratamiento	3	69.901	23.3002	57.65	0			
			Error	8	20300	2538					
			Total	11	187515						

**PRUEBA DE COMPARACIONES MULTIPLES**

	1 hora de extracción			2 horas de extracción			3 horas de extracción		
Solventes	N	Media	Grupo	N	Media	Grupo	N	Media	Grupo
Acetona	3	1102.3	A	3	1292.28	A	3	1329.2	A
Meoh	3	995.4	B	3	1177.4	B	3	1133.8	B
EtOh	3	878.1	C	3	1063	C	3	1047.7	B
AguaSub	3	635.98	D	3	948.6	D	3	1033.1	B

*Fuente:* Elaboracion propia



*Fuente:* Elaboracion propia

**Anexo 9. ANOVA y prueba de comparaciones (Tukey) de los valores CAET (mg ET/mg extracto seco) a 1, 2 y 3 horas de extracción.**

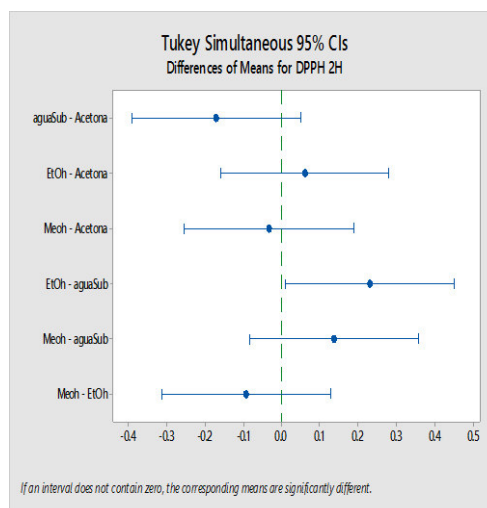
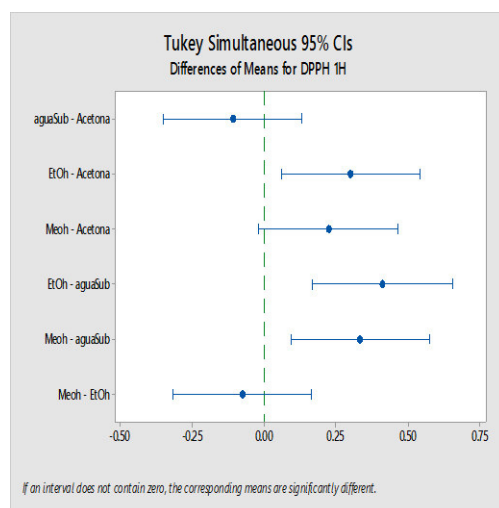
**ANOVA**

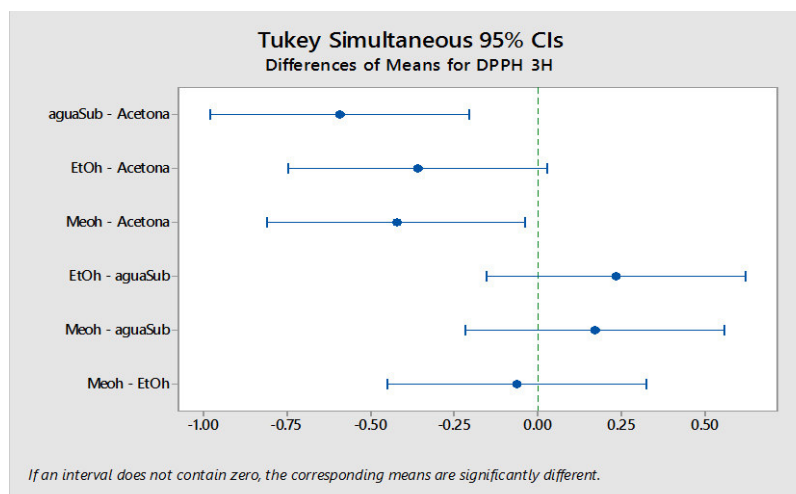
1 Hora						2 Horas					
Fuente	GL	SC	CM	Valor F	Valor P	Fuente	GL	SC	CM	Valor F	Valor P
Tratamiento	3	0.3278	0.109267	12.8	0.002	Tratamiento	3	0.08543	0.028475	4.03	0.051
Error	8	0.06827	0.008533			Error	8	0.05647	0.007058		
Total	11	0.39607				Total	11	0.14189			
3 Horas											
Fuente	GL	SC	CM	Valor F	Valor P						
Tratamiento	3	0.5612	0.18705	8.56	0.007						
Error	8	0.1747	0.02184								
Total	11	0.7359									

**PRUEBA DE COMPARACIONES MULTIPLES**

Solventes	1 hora de extracción			2 horas de extracción				3 horas de extracción			
	N	Media	Grupo	Solventes	N	Media	Grupo	Solventes	N	Media	Grupo
EtOh	3	0.95	A	EtOh	3	1	A	Acetona	3	1.533	A
Meoh	3	0.873	A B	Acetona	3	0.94	A B	EtOh	3	1.173	A B
Acetona	3	0.65	B C	Meoh	3	0.91	A B	Meoh	3	1.11	B
AguaSub	3	0.54	C	aguaSub	3	0.77	B	aguaSub	3	0.94	B

*Fuente:* Elaboracion propia

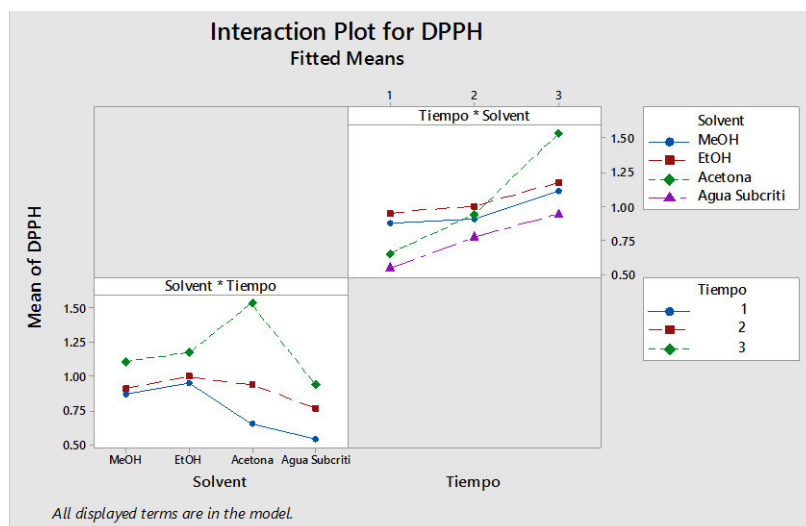
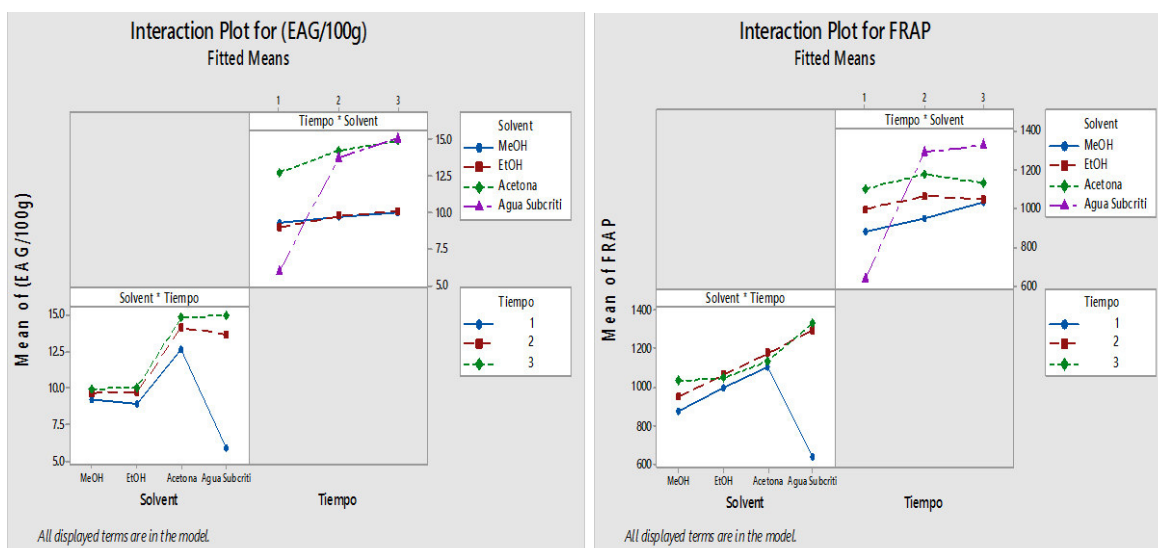




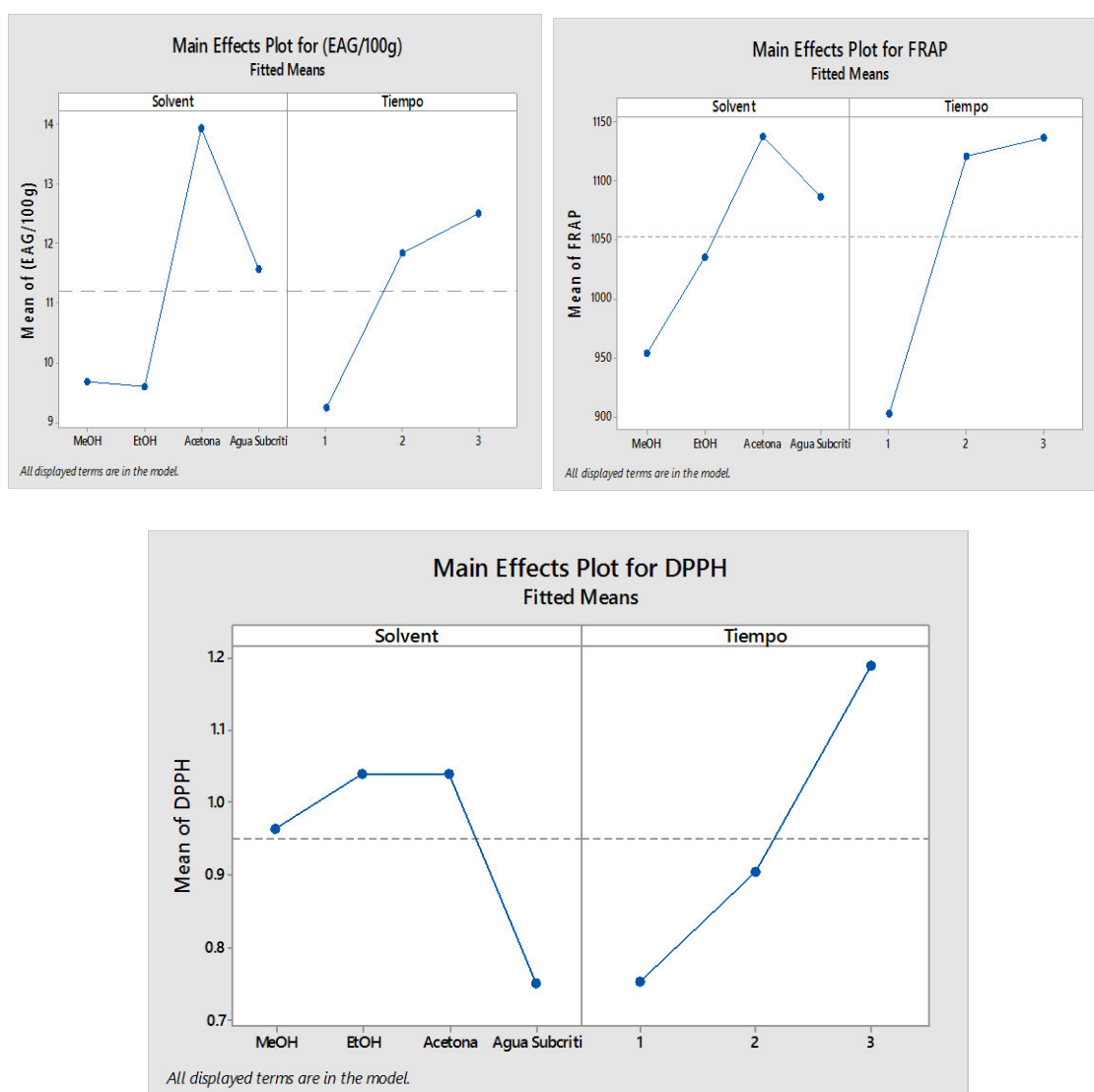
*Fuente:* Elaboracion propia



**ANEXO 10. Gráficos de interacción de los promedios de los CF, FRAP y CAET en función del solvente y el tiempo. Generados con el Minitab a partir del diseño factorial**



**ANEXO 11. Gráficos de efecto principal de los promedios de los CF, FRAP y CAET en función del solvente y el tiempo. Generados con el Minitab a partir del diseño factorial**



**ANEXO 12. Prueba de normalidad de los diámetros de los halos formados por acción del extracto de la semilla de uva ( $\alpha= 0.01$ )**

➤ Prueba de normalidad:

Ho: Los diámetros de los halos formados por los extractos de la semilla presentan distribución normal

Ha: Los diámetros de los halos formados por los extractos de la semilla no presentan distribución normal

Shapiro-Wilk			
Descripción	Estadístico	gl	Sig.
Tm.EtOH 15mg	0.908	6	0.421
Tm MeOH 15 mg	0.822	6	0.091
<i>T. rubrum</i> EtOH 15 mg	0.915	6	0.473
<i>T. rubrum</i> MeOH 15 mg	0.915	6	0.473
<i>Candida</i> . EtOH 15 mg	0.853	6	0.167
<i>Candida</i> MeOH 15 mg	0.853	6	0.167
Tm.EtOH 25mg	0.866	6	0.212
Tm MeOH 25 mg	0.960	6	0.820
<i>T. rubrum</i> EtOH 25 mg	0.827	6	0.101
<i>T. rubrum</i> MeOH 25 mg	0.866	6	0.212
<i>Candida</i> . EtOH 25 mg	0.853	6	0.167
<i>Candida</i> .MeOH 25 mg	0.853	6	0.167
Tm.EtOH 35mg	0.866	6	0.212
Tm MeOH 35 mg	0.866	6	0.212
<i>T. rubrum</i> EtOH 35 mg	0.823	6	0.093
<i>T. rubrum</i> MeOH 35 mg	0.927	6	0.557
<i>Candida</i> EtOH 35 mg	0.822	6	0.091
<i>Candida</i> MeOH 35 mg	0.866	6	0.212

*Tm: Trichophyton mentagrophytes*

*Fuente:* Elaboracion propia

Conclusión: Se acepta la Ho, los diámetros de los halos tienen distribución normal.

➤ Prueba de homogeneidad de varianza

Ho: Los diámetros de halo presentan homogeneidad de varianza

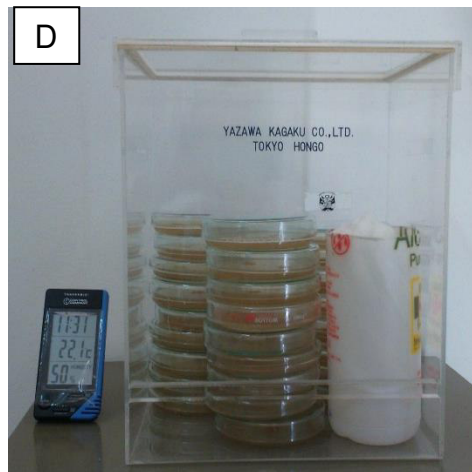
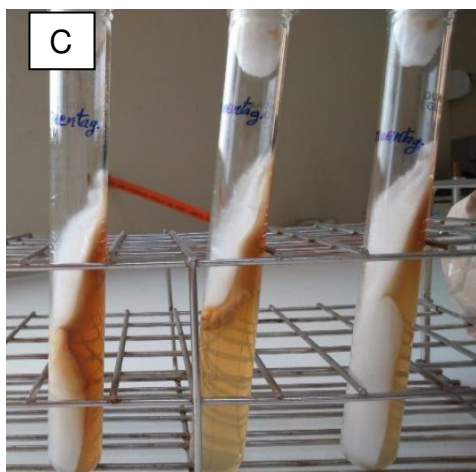
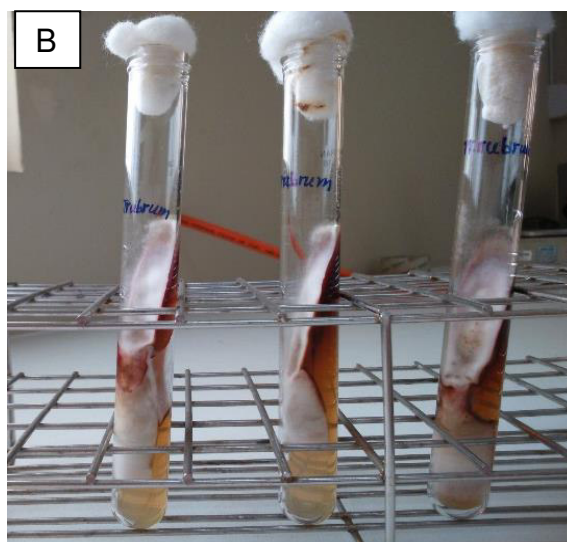
Ha: Los diámetros de halo no presentan homogeneidad de varianza

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Tm EOH	,822	2	15	,458
Tm MeOH	1,674	2	15	,221
<i>T. rubrum</i> EtOH	,505	2	15	,613
<i>Trubrum</i> MeOH	5,813	2	15	,014
<i>Candida</i> EtOH	2,500	2	15	,116
<i>Candida</i> MeOH	,899	2	15	,428

*Tm: Trichophyton mentagrophytes*

Conclusión: Los valores  $P > 0.01$ , por lo tanto, se acepta la Ho. Los diámetros de halo presentan homogeneidad de varianza.

**ANEXO 13. Cepas de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Candida albicans* A.-Adquiridas del Instituto Nacional de Salud. B.- Resiembra *T. rubrum*. C.-Resiembra *T. mentagrophytes* D.- Cultivo en Agar**



*Fuente:* Elaboracion propia